

# Design und Synthese von naturstoffbasierten chemischen Sonden und rational-entworfenen Wirkstoffen für 14-3-3 Adapter-Proteine



Meiner Frau und meinen Eltern

II

Die vorliegende Arbeit wurde in dem Zeitraum von Oktober 2007 bis Juni 2011 am Chemical Genomics Centre der Max-Planck-Gesellschaft in Dortmund sowie in dem Zeitraum von Juli 2011 bis August 2012 am Zentrum für Medizinische Biotechnologie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Markus Kaiser
2. Gutachter: Prof. Dr. Christian Ottmann
3. Gutachter: Prof. Dr. Peter Bayer

Vorsitzende des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Angela Sandmann

Tag der mündlichen Prüfung: 20. März 2013

Teile dieser Dissertation sind in folgender Publikation enthalten:

*Impaired Binding of 14-3-3 to C-RAF in Noonan Syndrome Suggests New Approaches in Diseases with Increased Ras Signaling*; Molzan, M., Schumacher, B., Ottmann, Co., Baljuls, A., Polzien, L., Weyand, M., Thiel, P., Rose, R., Rose, M., Kuhenne, P., Kaiser, M., Rapp, U. R., Kuhlmann, J., Ottmann, Ch.; *Moll. Cell. Biol.* **2010**, 30, 4698-4711.

# Inhaltsverzeichnis

---

## Inhaltsverzeichnis

|   |     |
|---|-----|
| <b>Abbildungsverzeichnis</b> .....  | 6   |
| <b>Tabellenverzeichnis</b> .....  | 10  |
| <b>1. Einleitung</b> .....  | 11  |
| 1.1 Niedermolekulare Wirkstoffe in der chemischen Biologie .....  | 11  |
| 1.2 Naturstoffe als chemische Sonden .....  | 13  |
| 1.3 Chemische Proteomik und Aktivitätsbasiertes Proteom-Profiling (ABPP).....   | 14  |
| 1.3.1 Aktivitätsbasiertes Protein Profiling (ABPP) .....  | 19  |
| 1.3.1.1 Aktivitätsbasierte Sonden (ABPs) .....  | 21  |
| 1.3.1.2 Anwendungen des ABPP.....   | 27  |
| 1.4 14-3-3 - Proteine .....   | 29  |
| 1.4.1 Struktur und Funktion von 14-3-3 Proteinen .....  | 31  |
| 1.4.2 Biologische Funktion von 14-3-3 Proteinen .....   | 33  |
| 1.5 Protein-Protein-Wechselwirkungen und deren niedermolekulare Modulation .  | 36  |
| <b>2. Zielsetzung</b> .....   | 39  |
| <b>3. Ergebnisse und Diskussion</b> .....   | 42  |
| 3.1 Synthese, Derivatisierung und biologische Untersuchung von (-)-A26771B ...  | 42  |
| 3.2 Adaption der etablierten Syntheseroute von (-)-A26771B auf die Synthese der Cladospoliden B-D .....                         | 64  |
| 3.3 Synthese von 14-3-3 Protein-Protein-Wechselwirkung Inhibitoren .....  | 70  |
| 3.4 Synthese und Wirkung von 14-3-3 Fusiccocin-Derivaten als Modulatoren der 14-3-3/C-RAF Protein-Protein Wechselwirkungen..... | 76  |
| 3.5 Synthese von 14-3-3 - MLF1-stabilisierenden Fragmenten .....  | 90  |
| 3.6 Synthese von kovalenten, zellgängigen 14-3-3 Inhibitoren .....  | 94  |
| <b>4. Zusammenfassung und Ausblick</b> .....  | 96  |
| <b>5. Experimenteller Teil</b> .....  | 100 |
| 5.1 Allgemeine Arbeitstechniken.....  | 100 |
| 5.1.1 Chemikalien.....  | 100 |

## Inhaltsverzeichnis

---

|  |            |
|--|------------|
| 5.1.2 Dünnschichtchromatographie (TLC).....  | 100        |
| 5.1.3 Säulenchromatographie .....  | 100        |
| 5.2 Analytische Verfahren .....  | 100        |
| 5.2.1 NMR-Spektroskopie .....  | 100        |
| 5.2.2 Hochleistungsflüssigchromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS) ..             | 101        |
| 5.2.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).....                           | 101        |
| 5.2.4 Hochauflösende Massenspektrometrie (HRMS) .....                                | 101        |
| 5.3 Präparative Vorschriften.....  | 102        |
| 5.3.1 Synthese der Makroliden und deren Derivaten .....                              | 102        |
| 5.3.2 Synthese des 14-3-3 PPI Inhibitors 47 .....                                    | 129        |
| 5.3.3 Synthese der Fusiccocin-Derivate als Modulatoren der 14-3-3/C-RAF PPI<br>..... | 134        |
| 5.3.4 Synthese der 14-3-3 - MLF1 stabilisierenden Fragmente.....                     | 143        |
| 5.3.5 Synthese der kovalenten, zellgängigen 14-3-3 Inhibitoren .....                 | 149        |
| 5.4 Aktivitätsbasierte Protein Profiling-Experimente .....                           | 151        |
| 5.4.1 Generelle Methoden .....   | 151        |
| 5.4.1.1 Pflanzenmaterial .....   | 151        |
| 5.4.1.2 Proteinextraktion von Arabidopsis thaliana-Blättern.....                     | 151        |
| 5.4.1.3 Labeling von A. thaliana-Blätterextrakten .....                              | 151        |
| <b>6. Literaturverzeichnis.....</b>  | <b>152</b> |
| <b>7. Anhang .....</b>   | <b>160</b> |

### Abbildungsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| <b>Abb. 1:</b> Vergleich von ABPP und CCCP .....   | 16 |
| <b>Abb. 2:</b> Arbeitsablauf der Target-Identifizierung mittels Affinitätsaufreinigung und Massenspektrometrie. ....               | 18 |
| <b>Abb. 3:</b> Aufbau einer aktivitätsbasierten Sonde .....  | 20 |
| <b>Abb. 4:</b> Wirkmechanismus der vier wichtigsten Klassen von chemischen Sonden..  | 22 |
| <b>Abb. 5:</b> 2-Schritt-ABPP: <b>(A)</b> Klick-Chemie; <b>(B)</b> Staudinger-Ligation.....  | 26 |
| <b>Abb. 6:</b> Gel-basiertes vergleichendes ABPP .....   | 27 |
| <b>Abb. 7:</b> Kompetitives ABPP .....   | 28 |
| <b>Abb. 8:</b> Übersicht über die Beteiligung von 14-3-3 Proteinen an verschiedenen Signalwegen .....                              | 30 |
| <b>Abb. 9:</b> Schematische Darstellung eines 14-3-3 Dimers.....   | 32 |
| <b>Abb. 10:</b> Strukturelle Effekte der 14-3-3 Bindung.....   | 34 |
| <b>Abb. 11:</b> Verschiedene Arten der Regulation von Interaktionspartnern durch 14-3-3 .....                                      | 35 |
| <b>Abb. 12:</b> Direkte PPI-Stabilisierung durch niedermolekulare Verbindungen .....   | 37 |
| <b>Abb. 13:</b> Zwei Intermediate für die Synthese von (-)-A26771B. ....   | 43 |
| <b>Abb. 14:</b> Verschiedene biologisch-aktive, 16-gliedrige Makrolide. ....   | 43 |
| <b>Abb. 15:</b> Retrosynthese von (-)-A26771B und N <sub>3</sub> -(-)-A26771B.....   | 44 |
| <b>Abb. 16:</b> erste Syntheseroute zu (-)-A26771B <b>(1)</b> .....  | 45 |
| <b>Abb. 17:</b> Synthesedetail zur Darstellung der Verbindung <b>6</b> ausgehend von <b>2</b> .....                                | 46 |
| <b>Abb. 18:</b> Synthesedetail zur Darstellung der Verbindung <b>6</b> ausgehend ihres entsprechenden Aldehyds. ....               | 47 |
| <b>Abb. 19:</b> Synthesedetail zur Darstellung der Verbindung <b>7</b> ausgehend von <b>6</b> in einer Grignard-Reaktion. ....     | 48 |
| <b>Abb. 20:</b> Testreaktion von Ethylmagnesiumbromid mit (S)-(+)-Epichlorohydrin unter den angegebenen Reaktionsbedingungen. .... | 48 |
| <b>Abb. 21:</b> Testreaktion zur Darstellung der Organometallverbindung mit einer iodierten Verbindung. ....                       | 49 |
| <b>Abb. 22:</b> Schematische Darstellung der Wurtz-Fittig-Reaktion. ....   | 50 |
| <b>Abb. 23:</b> Verschiedene Darstellung von <b>1</b> ausgehend von <b>9</b> .....   | 50 |
| <b>Abb. 24:</b> optimierte Syntheseroute zu (-)-A26771B <b>(1)</b> .....   | 51 |
| <b>Abb. 25:</b> Struktur des mit Rhodamin-markierten (-)-A26771B-Derivates <b>(13)</b> . ....                                      | 53 |
| <b>Abb. 26:</b> Synthese des Rhodamin-markierten Naturstoffderivates <b>13</b> .....   | 53 |

## Abbildungsverzeichnis

---

|   |    |
|---|----|
| <b>Abb. 27:</b> ABPP-Ansatz mit der Rhodamin-markierten Sonde <b>13</b> .....   | 54 |
| <b>Abb. 28:</b> Reaktion eines Nucleophils (Nu) an ein Michael-System. ....   | 55 |
| <b>Abb. 29:</b> funktionellen Einheiten des Naturstoffes (-)-A26771B ( <b>1</b> ).....  | 56 |
| <b>Abb. 30:</b> Synthesedetail zur Synthese des Azid-modifizierten Makrolids <b>18</b> .....  | 56 |
| <b>Abb. 31:</b> Syntheseroute zu N <sub>3</sub> -(-)-A26771B ( <b>12</b> ) .....  | 57 |
| <b>Abb. 32:</b> getestete Azid-Derivate basierend auf Makrolid <b>1</b> . ....  | 58 |
| <b>Abb. 33:</b> Synthese der Reportereinheit <b>21</b> .....  | 58 |
| <b>Abb. 34:</b> pH-abhängige <i>in vitro</i> -Inkubation von <b>20</b> in <i>Arabidopsis thaliana</i> -Zellkulturextrakt .....  | 59 |
| <b>Abb. 35:</b> Versuchte Synthese der trifunktionalen Sonden <b>22</b> , <b>23</b> , <b>24</b> und <b>83</b> .....   | 61 |
| <b>Abb. 36:</b> Primäre Wurzellänge nach 10-tägiger Keimung bei vorheriger Infizierung der Pflanzen mit dem Naturstoff (-)-A26771B ( <b>1</b> ) bei verschiedenen Konzentrationen ..... | 62 |
| <b>Abb. 37:</b> Laterale Wurzeldichte nach 10-tägiger Keimung bei vorheriger Infizierung der Pflanzen mit (-)-A26771B ( <b>1</b> ) bei verschiedenen Konzentrationen.....               | 63 |
| <b>Abb. 38:</b> Übersicht über die Cladopoliden B ( <b>25</b> ), C ( <b>26</b> ) und D ( <b>27</b> ). ....  | 64 |
| <b>Abb. 39:</b> Retrosynthese der Cladopoliden B-D und deren Azid-versehenen Derivaten. ....  | 65 |
| <b>Abb. 40:</b> Geplante Syntheseroute zur Darstellung des Naturstoffes Cladospolid B ( <b>25</b> ) und einem N <sub>3</sub> -modifizierten Derivat ( <b>37</b> ) .....                 | 66 |
| <b>Abb. 41:</b> Geplante Syntheseroute zur Darstellung des Naturstoffes Cladospolid C ( <b>26</b> ) und einem N <sub>3</sub> -modifizierten Derivat ( <b>38</b> ). ....                 | 67 |
| <b>Abb. 42:</b> Geplante Syntheseroute zur Darstellung des Naturstoffes Cladospolid D ( <b>27</b> ) und einem N <sub>3</sub> -modifizierten Derivat ( <b>39</b> ). ....                 | 67 |
| <b>Abb. 43:</b> Versuche zur Durchführung der ringschließenden Metathese am Beispiel der Synthese von Cladospolid C. ....   | 69 |
| <b>Abb. 44:</b> Bindungsmodus von <b>47</b> mit 14-3-3 Proteinen .....  | 70 |
| <b>Abb. 45:</b> Potentielle Inhibitoren für 14-3-3 Proteine. ....   | 71 |
| <b>Abb. 46:</b> Retrosynthese zur Darstellung von potentiell-bioreaktiven 14-3-3-PPI-Inhibitoren.....   | 71 |
| <b>Abb. 47:</b> Wege zur Darstellung des ersten Fragmentes <b>50</b> .....  | 72 |
| <b>Abb. 48:</b> Wege zur Darstellung des zweiten Fragmentes <b>43</b> . ....  | 73 |
| <b>Abb. 49:</b> Wege zur Synthese des geschützten Inhibitors mit einer Chloromethylketon-Einheit.....   | 73 |

## Abbildungsverzeichnis

---

|   |    |
|---|----|
| <b>Abb. 50:</b> Synthese des 14-3-3 Inhibitors <b>40</b> .....  | 74 |
| <b>Abb. 51:</b> Strategie der benzyllischen Entschützung bei der Synthese von <b>40</b> .....   | 75 |
| <b>Abb. 52:</b> Strukturanalyse eines 14-3-3 $\zeta$ -Dimers im Komplex mit einem C-RAFpSer <sup>259</sup> Phosphopeptid.....   | 77 |
| <b>Abb. 53:</b> Der molekulare Bindungsmodus des C-RAFSer <sup>259</sup> Phosphopeptides in der 14-3-3 Bindungstasche.....  | 78 |
| <b>Abb. 54:</b> Kristallstruktur des C-RAF-pSer <sup>259</sup> Phosphopeptides im Komplex mit 14-3-3 $\sigma$ .....   | 79 |
| <b>Abb. 55:</b> Kristallstruktur eines Komplexes eines verkürzten C-RAF-pSer <sup>259</sup> Phosphopeptides mit 14-3-3 $\sigma$ .....   | 79 |
| <b>Abb. 56:</b> Überlagerung des im Typ I-Motiv bindenden (nativen) C-RAFSer <sup>259</sup> Phosphopeptides, des Typ III-Motiv bindenden C-RAFSer <sup>259</sup> Phosphopeptides und FCA.....             | 80 |
| <b>Abb. 57:</b> (A) Struktur von Fusicoccin A. (B) Übersicht über die synthetisierten, Fusicoccin-ähnliche Derivate <b>52 - 68</b> .....  | 81 |
| <b>Abb. 58:</b> Synthese der Fusicoccin-ähnlichen Derivate <b>56 - 59</b> sowie <b>61 – 63</b> .....  | 82 |
| <b>Abb. 59:</b> Synthese der Fusicoccin-ähnlichen Derivate <b>52 - 55, 60</b> und <b>64 – 68</b> .....  | 83 |
| <b>Abb. 60:</b> Überlagerte Kristallstruktur des im 14-3-3 $\sigma$ /QRSTpSTNVH-COOH - Komplex gebundenen Fragments <b>60</b> mit Fusicoccin A.....   | 85 |
| <b>Abb. 61:</b> SPR-Analyse der Fragmente <b>52</b> bis <b>68</b> auf ihre stabilisierenden Eigenschaften eines GST-C-RAF <sub>220-268</sub> S259D/14-3-3 $\sigma$ -Komplexes.....                        | 86 |
| <b>Abb. 62:</b> SPR-Analyse der Bindung von <b>60</b> an den binären Komplex.....   | 87 |
| <b>Abb. 63:</b> Stabilisierung der Wechselwirkung zwischen 14-3-3 und Vollängen-C-RAF durch das Fusicoccin A Fragment <b>60</b> .....   | 88 |
| <b>Abb. 64:</b> Mögliches Modell der chemotherapeutischen Modulation des Ras-RAF-MEK-ERK-Signalweges durch synthetische, kleine Fragmente, welche den inhibierenden RAF/14-3-3 Komplex stabilisieren..... | 89 |
| <b>Abb. 65:</b> Kristallstruktur des 14-3-3 $\epsilon$ Dimers im Komplex mit einem MLF1(29-42)pSer34-Modellpeptid.....  | 90 |
| <b>Abb. 66:</b> Bindung von 3-Pyrrolidinol ( <b>78</b> ) an den 14-3-3 $\epsilon$ /MLF1(29-42)pSer-Komplex.....   | 91 |
| <b>Abb. 67:</b> Synthesestrategie zur Darstellung der potentiellen MLF1/14-3-3 Stabilisatoren <b>69 – 77</b> , die auf dem 3-Pyrrolidinol ( <b>78</b> )-Gerüst basieren.....                              | 92 |
| <b>Abb. 68:</b> Struktur von 14-3-3 im Komplex mit ExoS-Modellpeptiden.....   | 94 |



## Abbildungsverzeichnis

---

**Abb. 69:** Synthesestrategie zur Darstellung der Phosphonatester **80** und **82** ..... 95

## **Tabellenverzeichnis**

---

### **Tabellenverzeichnis**

|  |    |
|--|----|
| <b>Tab. 1:</b> Vor- und Nachteile des Aktivitätsbasierten Protein Profilings ..... | 20 |
|--|----|

## 1. Einleitung

### 1.1 Niedermolekulare Wirkstoffe in der chemischen Biologie

In der chemischen Biologie nutzt man bioaktive, niedermolekulare Substanzen als chemische Sonden zur Untersuchung biologischer Fragestellungen. Dementsprechend spielt die Entwicklung von niedermolekularen Wirkstoffen, die mit spezifischen Proteinen *in vivo* wechselwirken, in der chemischen Biologie eine herausragende Rolle. Um in der chemischen Biologie einsetzbar zu sein, müssen solche chemischen Sonden jedoch eine Vielzahl an Kriterien erfüllen, worin die eigentliche Schwierigkeit bei der Auffindung geeigneter Verbindungen liegt <sup>[1]</sup>. So sollten die chemischen Sonden

- i) eine *in vitro* Wirkung gegen das Target besitzen;
- ii) optimalerweise über eine *in vitro* Selektivität gegen das Paralog des Targets verfügen;
- iii) eine *in vitro* Selektivität gegen andere molekulare Targets, die mit dem Target in Wechselwirkung treten, besitzen;
- iv) über einen definierten Wirkmechanismus mit dem Target wechselwirken;
- v) über eine zellbasierte Aktivität entsprechend zur mutmaßlichen Pharmakologie des Targets verfügen;
- vi) eine geringe Cytotoxizität aufweisen;
- vii) chemisch stabil sein;
- viii) über definierte Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (SAR, *structure activity relationship*) mit dem Target wechselwirken;
- ix) und mittels etablierter Syntheserouten oder durch Isolation aus natürlichen Ressourcen erhaltbar sein.

## Einleitung

---

Eine der größten Aufgaben bei der Auffindung neuer niedermolekularer Verbindungen als chemische Sonden ist die Aufklärung ihrer molekularen Targets. Leider ist dieser Prozess heutzutage immer noch sehr herausfordernd und mit zeitaufwändigen und intensiven Laborarbeiten verbunden. Die Aufgabe wird durch vielfältige Probleme, wie z.B. durch einen starken Hintergrund aufgrund unspezifischer Naturstoff-Protein-Wechselwirkungen oder der schweren „Fassbarkeit“ einiger Proteine, z.B. aufgrund niedriger zellulärer Abundanz oder Lokalisation in Membranen, erschwert <sup>[2-3]</sup>.

Die meisten Methoden basieren dabei auf einer Derivatisierung der Ausgangsverbindung, um die Anbindung des Naturstoffes an eine Identifizierungseinheit wie Biotin oder ein Fluorophor zu ermöglichen. Idealerweise erfolgt eine solche Modifikation des Naturstoffs an solchen Stellen des Moleküls, welche nur einen geringen Einfluss auf die Bindung an das Proteintarget haben, so dass das erhaltene Derivat über ein vergleichbares Aktivitätsprofil verfügt. Hierfür sind jedoch oftmals Totalsynthesen der Ausgangsverbindungen von Nöten. Ein weiterer großer Nachteil dieser chemischen Modifikation liegt jedoch darin, dass neben dem präparativen Aufwand die Aktivität einer funktionalisierten Verbindung häufig doch geringer als die der Ausgangsverbindung ist <sup>[4-6]</sup>.

### 1.2 Naturstoffe als chemische Sonden

Zur Auffindung geeigneter, niedermolekularer Verbindungen zur Anwendung in der chemischen Biologie greift man häufig auf Naturstoffe zurück. So erkannte der Mensch schon in der Frühzeit, dass aus Tieren, Pflanzen und Mikroben isolierte Stoffe Bioaktivitäten besitzen <sup>[7]</sup>. Heute sind ca. 40% der Therapeutika von biologischen Quellen abgeleitet und naturstoffbasierte Wirkstoffscreens liefern mehr Treffer als synthetische Bibliotheken <sup>[8-11]</sup>. Dementsprechend werden Naturstoffe bzw. deren molekulare Gerüste häufig auch als privilegierte Strukturen bezeichnet, welche durch Evolution biologisch pre-validiert wurden. Die exquisite Bioaktivität der Naturstoffe basiert auf einer hochaffinen Wechselwirkung mit Proteintargets, welche häufig auf nichtkovalenten Interaktionen beruhen.

Einige Naturstoffe interagieren jedoch auch unter Ausbildung einer kovalenten Bindung an das Target; so enthalten einige Naturstoffe reaktive funktionelle Gruppen wie Epoxide,  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Lactone oder Lactame, welche mit nucleophilen Gruppen an einem Protein reagieren können. Ein bekanntes Beispiel hierfür ist das Antibiotikum Penicillin, bei welchem ein gespanntes  $\beta$ -Lactamsystem als bioreaktive Einheit dient <sup>[8]</sup>.

Bioreaktive Naturstoffe können für eine Vielzahl von Anwendungen eingesetzt werden. Dabei sind diese neben „klassischen“ Anwendungen wie z.B. in chemischen Genetikscreens, als Modulatoren ausgewählter Proteine in komplexen Signalwegen, usw. auch insbesondere als Werkzeuge in der chemischen Proteomik geeignet <sup>[12]</sup>.

### 1.3 Chemische Proteomik und Aktivitätsbasiertes Proteom-Profiling (ABPP)

Im letzten Jahrzehnt führte die vollständige DNA-Sequenzierung von multiplen Organismen zu einer vollständigen Übersicht des genomischen Inventars und somit prinzipiell aller in diesen Organismen möglichen Genprodukten. Im überwiegenden Fall sind dies Proteine, von denen bisher jedoch noch nicht für alle eine Funktion zugeordnet werden konnte.

Die Gesamtheit aller zu einem gegebenen Zeitpunkt oder physiologischer Bedingung in einer Zelle oder Organismus vorkommenden Proteine fasst man unter dem Begriff des Proteoms zusammen. Ziel der Proteomik ist die Untersuchung des gesamten Proteoms zu unterschiedlichen Zeitpunkten bzw. Zuständen, z.B. hinsichtlich seiner Veränderungen beim Übergang von einer gesunden Zelle in einen pathologischen Zustand <sup>[13-15]</sup>. Die Proteomik hat mittlerweile einen Entwicklungsstand erreicht, der die Identifikation und Studie von tausenden Proteinen in einem einzigen Experiment ermöglicht. Solche Experimente können z.B. dazu dienen, die Funktion von Proteinen aufzuklären. Dazu gibt es einen großen Bedarf, da bisher für eine große Anzahl an Proteinen (ca. 30 - 50 % des menschlichen Genoms) die genauen Funktionen noch nicht aufgeklärt werden konnten <sup>[16]</sup>. Oft werden bei proteomischen Studien auch Proteine identifiziert, die eine besondere Rolle in verschiedenen Krankheiten spielen und somit potentiell neue Targets für eine chemotherapeutische Modulation darstellen können <sup>[12]</sup>.

Trotz aller technischen und methodologischen Weiterentwicklungen bleibt die Untersuchung des Proteoms aufgrund seiner immensen Komplexität eine herausfordernde Aufgabe. Daher werden nach Möglichkeiten gesucht, die Komplexität des Proteoms durch gezielte Auswahl einzelner Proteine aus dem Proteom zu reduzieren. Bei der chemischen Proteomik erfolgt diese Auswahl mittels niedermolekularer Verbindungen <sup>[17-19]</sup>.

Die meisten chemischen Proteomik-Messungen stellen eine „postgenomische“ Version der klassischen Wirkstoff-Affinitätschromatographie dar, gekoppelt mit anschließender hochauflösender Massenspektrometrie-Analyse (HR-MS) und bioinformatischer Analyse. Dabei finden hauptsächlich zwei verschiedene Ansätze Anwendung <sup>[20]</sup> (Abb. 1):

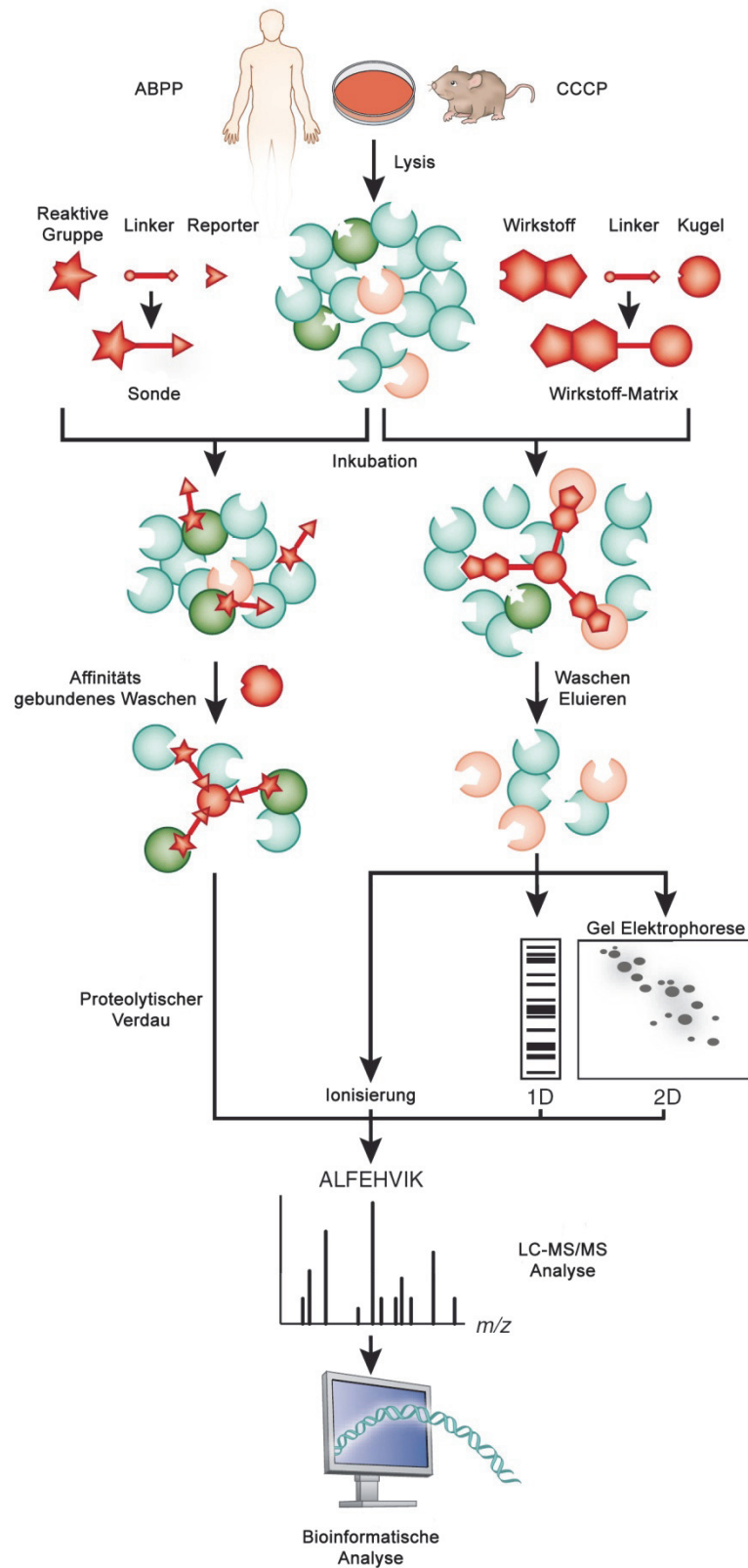
## Einleitung

---

1) Aktivitätsbasiertes Protein-Profilig (ABPP, *activity-based protein profiling*), bei welchem eine Auswahl mittels niedermolekularer Verbindungen (sogenannter aktivitätsbasierter Sonden, ABP, *activity-based probes*) auf enzymatisch-aktive Proteine erfolgt (siehe auch Abschnitt 1.3.1).

2) Verbindungszentrierte Chemische Proteomik (CCCP, *compound-centric chemical proteomics*), deren Fokus auf der Charakterisierung des molekularen Wirkungsmechanismus einer individuellen, bioaktiven, niedermolekularen Verbindung liegt.

Trotz der Unterscheidung zwischen zwei verschiedenen Ansätzen sind in der Praxis die Unterschiede zwischen beiden häufig fließend. So wird die Targetidentifizierung von modifizierten Sonden häufig auch als ein ABPP-artiger Ansatz bezeichnet (so auch in dieser Arbeit).



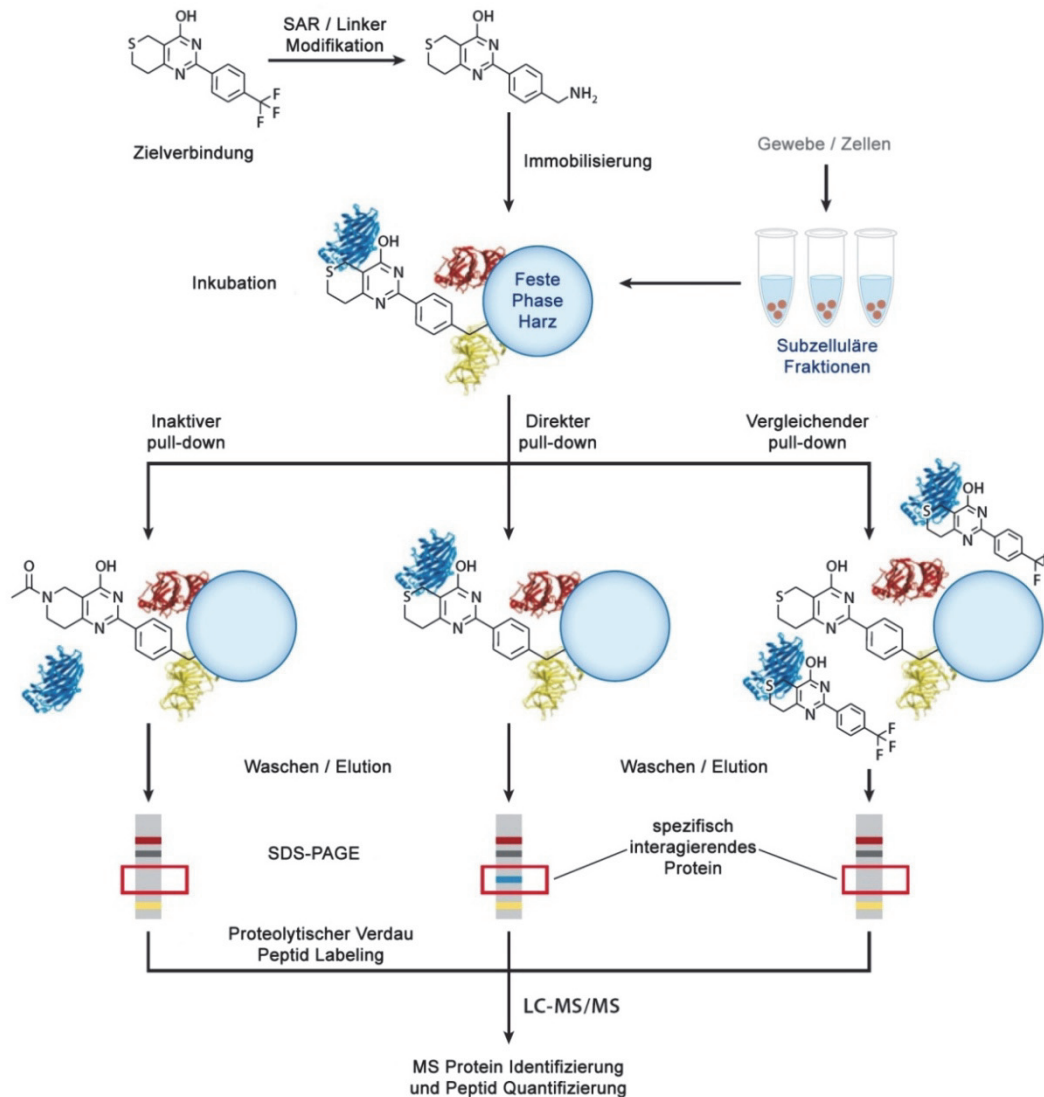
**Abb. 1:** Vergleich von aktivitätsbasiertem Protein Profiling (ABPP) und Verbindungszentrierter Chemischer Proteomik (CCCP) (modifiziert nach [20]).



## Einleitung

---

In beiden Ansätzen spielt die Aufklärung des Targets eine bedeutende Rolle. Meistens erfolgt diese durch eine Anreicherung des Targetproteins, z.B. durch Affinitätschromatographie, gefolgt von einer massenspektrometrischen Analyse der Bindeproteine (Abb. 1) <sup>[20-24]</sup>. Die größte Herausforderung bei einem solchen Ansatz bleibt jedoch die Komplexität des Proteoms, welches durch einen dynamischen Bereich der Proteinexpression von  $10^6$  charakterisiert ist. Generell gilt daher, dass eine Targetidentifizierung umso besser gelingt, je höher die Affinität und je reichhaltiger das Zielprotein vorliegt. Niedermolekulare Verbindungen sollten also für die Affinitätsreinigung eine hohe Affinität gegenüber ihrem Target besitzen. Verbindungen mit geringer Affinität gegenüber ihrem Target hingegen gehen häufig während der Waschschrte bei der Affinitätschromatographie verloren. Praktisch bedeutet das, dass sich nur Substanzen mit einem  $IC_{50}$  und  $EC_{50}$  im nanomolaren Bereich für die Affinitätsreinigung eignen (Abb. 2) <sup>[22]</sup>.

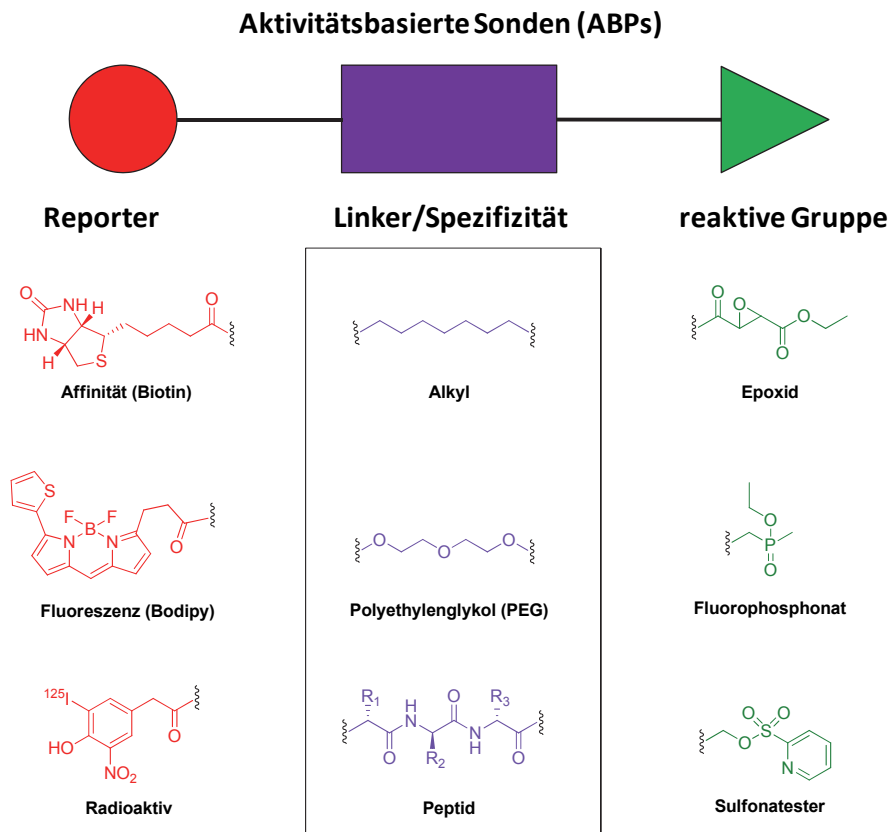


**Abb. 2:** Arbeitsablauf der Target-Identifizierung mittels Affinitätsaufreinigung und Massenspektrometrie. Ausgehend von der bioaktiven Substanz wird eine Struktur-Aktivitäts Beziehungsanalyse durchgeführt, um mögliche Positionen für eine Modifizierung der Substanz mit einem Linker zu erhalten. Das hergestellte Derivat wird dann auf einer festen Phase immobilisiert und diese mit dem Proteomlysate inkubiert. Anschließend werden die in einem direkten Pull-Down (Mitte) affinitätsgebundene Proteine nach intensivem Waschen von der festen Phase eluiert und durch SDS-PAGE getrennt. Die spezifischen Banden werden proteolytisch verdaut und die Proteine über Flüssigkeitschromatographie - Tandem Massenspektrometrie (LC-MS/MS) identifiziert. Um spezifische Targetproteine von nichtspezifischen Wechselwirkungen zu unterscheiden, werden hierzu parallele Experimente wie z.B. ein inaktiver Pull-Down (Pull-down mit immobilisierter, inaktiver Verbindung, links) oder ein kompetitiver Pull-Down (Waschen mit freien, aktiven Komponenten, rechts) durchgeführt. In beiden Fällen werden die spezifisch bindenden Proteine entfernt, so dass durch Vergleich der identifizierten Proteine des direkten Pulldowns mit denen des indirekten Pull-Downs oder des vergleichenden Pull-Downs das spezifische Targetprotein der Substanz identifiziert werden kann (modifiziert nach <sup>[22]</sup>).

### **1.3.1 Aktivitätsbasiertes Protein Profiling (ABPP)**

Mittels ABPP lassen sich direkt im komplexen Proteom quantitativ die Aktivitätszustände von Enzymen bestimmen <sup>[17-20]</sup>. Setzt man dieses Verfahren in einem Screening ein, so können mittels ABPP z.B. biochemische Aktivitäten annotiert werden oder Funktionen von Enzymen, z.B. in der Entstehung von Krankheiten, untersucht werden.

Zur Durchführung eines ABPP wird ein Lysat mit einer chemischen Sonde, der aktivitätsbasierten Sonde (activity based probe, ABP), behandelt und die kovalent an den Wirkstoff gebundenen Proteine identifiziert <sup>[20]</sup>. Eine ABP ist modular aufgebaut und besteht aus einem „warhead“ (einer bioreaktiven Gruppe, welche an das aktive Zentrum eines Enzymes bindet), einem Linker und einem Reportertag (Abb. 3). Um eine kovalente Bindung zwischen dem Protein und der Sonde zu erreichen, werden als „warhead“ meistens irreversible Enzyminhibitoren, welche kovalent an das aktive Zentrum des Enzyms binden, verwendet. Alternativ werden gelegentlich reversiblen Inhibitors als „warhead“ eingesetzt, welche mit einer photoreaktiven Gruppe gekoppelt werden, um nach einer UV-Aktivierung eine kovalente Bindung an das Enzym zu induzieren <sup>[25-26]</sup>.



**Abb. 3:** Aufbau einer aktivitätsbasierten Sonde (modifiziert nach <sup>[27]</sup>).

Als Reportereinheit wird dabei häufig Biotin oder Rhodamin verwendet <sup>[20]</sup>. Dabei kann Biotin nicht nur als Reporter dienen, sondern auch zur Affinitätsaufreinigung der Proteintargets der Sonde verwendet werden. Die Vor- und Nachteile des ABPP sind nachfolgend in Tab. 1 aufgeführt <sup>[28]</sup>:

**Tab. 1:** Vor- und Nachteile des Aktivitätsbasierten Protein Profiling (modifiziert nach <sup>[28]</sup>).

| Vorteile  | Nachteile   |
|---|---|
| liefert quantitative Aussagen über Enzymaktivitäten | limitiert auf chemische Verbindungen (inkl. Naturstoffen), die ein Proteintarget irreversibel binden  |
| kann <i>in vivo</i> genutzt werden                  | bei Verwendung von Naturstoffen als ABP muss der Naturstoff durch die Einführung eines Labeling-Tags zuerst chemisch modifiziert werden; dabei kann die Modifikation auch die biologische Aktivität des Naturstoffes beeinflussen |

## Einleitung

---

Nachdem das Zelllysate mit der aktivitätsbasierten Probe (ABP) inkubiert wurde, werden die gebundenen Proteine über eine Affinitätsmatrix vom Lysat getrennt und anschließend mit Trypsin für die massenspektrometrische Analyse verdaut. Dieser Trypsinfingerprint wird dann (mittels Datenbankabgleichen) zur Identifizierung der Targetproteine herangezogen <sup>[20]</sup>.

### **1.3.1.1 Aktivitätsbasierte Sonden (ABPs)**

Im Folgenden soll noch einmal im Detail auf den Aufbau von aktivitätsbasierten Sonden (ABPs) eingegangen werden. Diese bestehen aus drei funktionellen Basiselementen <sup>[19]</sup>: Eine reaktive Gruppe für eine kovalente Bindung an das Enzym, eine Linker-Region, die die Reaktivität und Spezifität der reaktiven Gruppe modulieren kann, und eine Einheit für die spätere Identifizierung und Reinigung des modifizierten Enzyms, den sogenannten Reporter (Abb. 3). Andere chemische Sonden, die nicht die katalytischen Einheiten in Proteinen und Enzymen attackieren, werden demgegenüber gelegentlich affinitätsbasierte Sonden (AFBP, *affinity-based probe*) genannt <sup>[27]</sup>.

#### *Die reaktive Gruppe*

Die reaktive Gruppe ist die kritischste Komponente einer aktivitätsbasierten Sonde. Sie muss einerseits reaktiv genug sein, um auch latente Nucleophile zu modifizieren. Andererseits darf ihre Reaktivität nicht zu unspezifischen Modifikationen im Proteom führen <sup>[27, 29-31]</sup>.

Man unterscheidet vier Klassen an bioreaktiven Sonden, wobei nur die ersten beiden Klassen „klassische“ ABPs darstellen (Abb. 4):

# Einleitung

| Sondenklasse                        | Mechanismus | Beispiel            |
|-------------------------------------|-------------|---------------------|
| I: Mechanismus-basiert<br>ABP       |             | DCG-04<br>FP-Biotin |
| II: Suizid Substrate<br>ABP         |             | DFPP<br>Sulbactam   |
| III: Affinitäts Alkylierend<br>AFBP |             | 5'-FSBA             |
| IV: Generell Alkylierend            |             | ICAT                |

**Abb. 4:** Wirkmechanismus der vier wichtigsten Klassen von chemischen Sonden mit mechanistischen Beispielen der Reaktivität der reaktive Gruppe (modifiziert nach <sup>[27]</sup>).

Bei Mechanismus-basierten ABPs ist das Nucleophil der katalytischen Einheit des Enzyms an der Reaktion mit dem Substrat beteiligt. Daher werden beim Design der Sonde häufig das Wissen über den Ablauf des katalytischen Mechanismus genutzt, um somit Enzym-spezifische ABPs zu entwerfen. In der Tat basieren die Mehrheit der ABPs auf diesem Prinzip <sup>[27]</sup>. Beispiele für diese Gruppe sind u.a. Peptidacyloxymethylketone und Epoxide, die ein effizientes und selektives Labeling von Cysteinproteasen der Caspase- und Papain-Familie erlauben <sup>[32-33]</sup>.

Suizid-Substrat-ABPs beinhalten ein maskiertes Elektrophil, welches nach einem Umsatz der Sonde im Zielenzym aktiviert wird. Das unmaskierte Elektrophil kann dann mit benachbarten, nicht katalytischen, nucleophilen Einheiten in der aktiven Seite reagieren <sup>[27]</sup>. Als Beispiel sei hier DFPP genannt; DFPP alkyliert spezifisch Protein-Phosphatasen <sup>[34-35]</sup>. Hierzu dephosphoryliert das Enzym zuerst den Inhibitor,

## Einleitung

---

wodurch die Bildung eines Quinonmethids induziert wird, welches dann mit einer nucleophilen Seitenkette (z.B. Lysin oder Cystein) im aktiven Zentrum reagieren kann. Insgesamt führt diese Reaktionssequenz also zu einer irreversiblen Alkylierung des Enzyms. Der Nachteil dieser Methode ist, dass auch durch die Entkopplung der enzymatischen Aktivierung der Sonde und der kovalenten Reaktion mit den nucleophilen Gruppen theoretisch auch unspezifisch anderer Proteine von der Sonde markiert werden können <sup>[36-39]</sup>.

Affinitäts-alkylierende Sonden (AFBPs) besitzen affinitätsbasierte Markierungseinheiten, die nur ein starkes Nucleophil oder Elektrophil in der Nähe der aktiven Einheit benötigen. Das Enzym muss für die Bindung nicht zwingend aktiv sein. AFBPs sind meist Substratanaloga, die ein reaktives Zentrum enthalten, welches mit nucleophilen Gruppen in einer Bindetasche reagieren oder durch einen „Trigger“ chemisch-aktiviert werden können. Klassische Beispiele hierfür sind photoaktive Gruppen, welche durch UV-Licht in hochreaktive Spezies überführt werden <sup>[40-41]</sup>.

Generell-alkylierende Sonden beinhalten unspezifische Alkylierungsgruppen, so dass diese aufgrund ihrer intrinsischen Reaktivität mit spezifischen Aminosäuren (z.B. Cystein) und nicht Proteinen reagieren. Diese Klasse an Sonden können z.B. zur Proteomanalyse durch Massenspektrometrie eingesetzt werden <sup>[42]</sup>. So werden Iodoacetamid-basierte Sonden beim sogenannten ICAT (isotop-codierter Affinitäts-Reporter) eingesetzt <sup>[43]</sup>. Diese reagieren unter Ausbildung einer kovalenten Bindung mit allen freien Sulfhydrylgruppen von Cysteineinheiten, wodurch unter Verwendung isotop-gelabelter Sonden verschiedene Proteomvergleichsexperimente möglich werden <sup>[27]</sup>.

Man unterscheidet ferner zwischen gerichteten und nicht-gerichteten ABPs. *Gerichtete ABPs* werden spezifisch für einzelne Enzymklassen entworfen. Solche selektiven ABPs werden meistens aus bekannten, mechanismusbasierten Enzyminhibitoren erhalten, deren reaktive Gruppen in ABPs eingebaut werden <sup>[18, 30]</sup>. Mittels dieses Ansatzes konnten eine Vielzahl chemischer Sonden für unterschiedlichste Enzymklassen (wie z.B. Serin-Hydrolasen oder Cystein-Proteasen <sup>[32, 44-45]</sup>) entwickelt werden.

## Einleitung

---

Bei den *nicht-gerichteten ABPs* sind die Proteintargets vor dem Design der Sonde noch nicht bekannt. Daher gehören elektrophile Naturstoffe, welche zur Targetidentifizierung mit einem Linker und Reporter versehen werden, z.B. zu den nicht-gerichteten ABPs. Neben Naturstoffen können nicht-gerichtete ABPs auch durch eine „freie“ Kombination von „milden“ Elektrophilen mit Linkern und Reportern gewonnen werden <sup>[18, 30]</sup>. So wurden von der Arbeitsgruppe Cravatt z.B. Sulfonatestersonden als nicht-gerichtete ABPs entwickelt, welche mechanistisch verschiedene Enzymklassen im Proteom adressieren <sup>[46]</sup>.

### *Der Linker*

Die Linker-Region verbindet die reaktive Gruppe mit der Reportereinheit, die der Identifizierung und Reinigung dient. Die Linkerregion kann vielen Zwecken dienen, wird aber primär genutzt, um einen Raumgewinn zwischen der reaktiven Gruppe und der Reportereinheit zu schaffen. Dies unterbindet etwaige sterische Hinderungen, die den Zugang der reaktiven Gruppe blockieren oder die spätere Zugänglichkeit des Reporters für die Reinigung und Identifikation erschweren könnte. Aus diesem Grund bestehen Linker-Regionen meistens aus langen Alkyl- oder Polyethylenglykolketten. Die Spezifität der Sonde kann ebenfalls durch die Wahl einer entsprechenden Linker-Region beeinflusst werden. So beeinflussen Alkyllinker die Hydrophobizität der Sonden und können somit für eine bessere Aufnahme in lebende Zellen oder Gewebe sorgen, während Polyethylenglykolketten eine höhere Löslichkeit hydrophober Sonden in wässrigen Lösungen bewirken können. Des Weiteren kann der Linker spezifische Elemente enthalten, die genutzt werden können, um eine Sonde genauer auf ein bestimmtes Enzym abzielen <sup>[27, 29]</sup>. Diese Elemente besitzen normalerweise die Form von peptidähnlichen Strukturen und werden vorrangig in ABPs verwendet, die Proteasen anzielen <sup>[47]</sup>.

### *Der Reporter*

Die Reportergruppe der chemischen Sonden dient zur schnellen und einfachen Identifikation und Reinigung der sondenmodifizierten Proteine. Im Prinzip ist der Reporter das herausragende Strukturelement, welches ABPs vom klassischen (häufig mechanismusbasierten Inhibitor) unterscheidet. Die am meisten genutzten Reportereinheiten sind Biotin, Rhodamin bzw. radioaktive Isotopen <sup>[27, 29]</sup>.



## Einleitung

---

Da Protein-Gele die einfachste und kostengünstigste Methode für eine Proteinauftrennung und -analyse darstellt, sollten die Reportereinheiten grundsätzlich kompatibel mit SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)-Auftrennungen sein. Biotin ermöglicht die Detektion durch Western-Blots mit Avidin bzw. Streptavidin. Fluoreszente und radioaktive Einheiten können durch direktes Scannen der Gele mit einem Fluoreszenzscanner oder Phosphorimager sichtbar gemacht werden <sup>[27, 29]</sup>. Der Vorteil dieser Methode gegenüber Biotin liegt in einer weniger zeit- und arbeitsintensiven Handhabung. Zudem besitzt diese Methode einen größeren und empfindlicheren Dynamikbereich als das Streptavidin-Biotin-Verfahren <sup>[27]</sup>. Biotin bleibt dennoch die am meisten genutzte Reportereinheit, da sie neben der Detektion auch eine Aufreinigung und somit Anreicherung gebundener Enzyme über Streptavidin-Affinitätsaufreinigungen ermöglicht <sup>[48-49]</sup>. Die Biotin-Streptavidin-Bindung ist eine der stärksten, nicht-kovalenten Wechselwirkungen (mit einer Assoziationskonstante von  $10^{15} \text{ M}^{-1}$  <sup>[50]</sup>) und erlaubt somit ein quantitatives Binden selbst kleinster Mengen an biotinylierten Enzymen.

### *2-Schritt ABPP und bioorthogonale Chemie*

Reporter wie Biotin oder fluoreszente Farbstoffe erlauben die Detektion von Targetproteinen und – im Falle von Biotin – auch eine Anreicherung von Targetproteinen als Voraussetzung für eine effiziente MS-Analyse mittels Affinitätschromatographie an Avidin-Säulen.

Demgegenüber sind diese Reporter jedoch sterisch häufig anspruchsvoll und verhindern dadurch eine potente Bindung der Sonden an ihre Targetproteine. Des Weiteren – und häufig schwerwiegender – verschlechtern Reportergruppen wie Biotin oder auch große Fluorophore die Zellgängigkeit und somit *in vivo* Anwendbarkeit von ABPs.

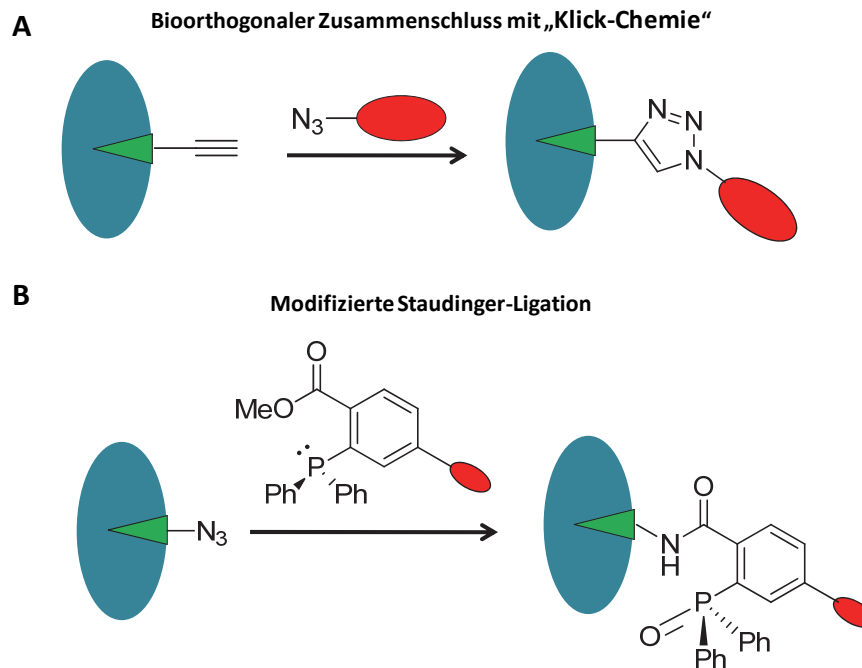
Daher wurde die Strategie des 2-Schritt ABPP entwickelt, bei welcher bioorthogonale Reaktionen ausgenutzt werden, um die Reporter nach dem eigentlichen ABPP in einem zweiten Schritt (der *in vitro* durchgeführt werden kann) an die markierten Proteine anzubringen. Dies hat den Vorteil, dass anstatt der großen Reportergruppen nur sogenannte „Minimal-Reporter“ an den ABPs angebracht sein müssen.

## Einleitung

Im Wesentlichen gibt es zwei bioorthogonale Reaktionen, die für ABPP verwendet werden (Abb. 5):

i) Cu(I) katalysierte Huisgen's [3+2] Azid-Alkin-Cycloaddition (Klick-Chemie) <sup>[51]</sup>

ii) Staudinger-Ligation <sup>[52]</sup>



**Abb. 5:** 2-Schritt-ABPP nutzt bioorthogonale Reaktionen, um das *in vivo*-Labelling von der Anbringung der eigentlichen Reportergruppen zu trennen. (A) Klick-Chemie; (B) Staudinger-Ligation (modifiziert nach <sup>[30]</sup>).

Die Reportereinheiten in ABPs werden deshalb beim 2-Schritt-ABPP durch biochemisch-inerte Azid- oder Alkin-Gruppen ersetzt und diese „Minimal“-Reporter-Sonden anschließend in lebenden Zellen angewandt <sup>[53-55]</sup>. Nach dem Proteinlabeling werden die Proteome mit den komplementären Reportereinheiten, welche ebenfalls Azid- oder Alkinmodifiziert vorliegen, gekoppelt. Das Produkt der Klick-Chemie ist ein 1,4-disubstituiertes Triazol, welches das sondengebundene Enzym kovalent an die Reportereinheit bindet und somit Target-Identifikation und -Detektion ermöglicht <sup>[30, 51]</sup>.

Die bioorthogonale Staudinger-Ligation hingegen basiert auf einer hochchemoselektiven Reaktion zwischen einem Azid und einem Phosphin, welche zur Bildung eines Aza-Ylids führt <sup>[56]</sup>. Wird ein Aza-Ylid in der Nähe eines elektrophilen Zentrums gebildet (z.B. bei Arylestern), hydrolysiert das Aza-Ylids über eine intramolekulare Zyklisierung, so dass die anschließende Hydrolyse der Stickstoff-

## Einleitung

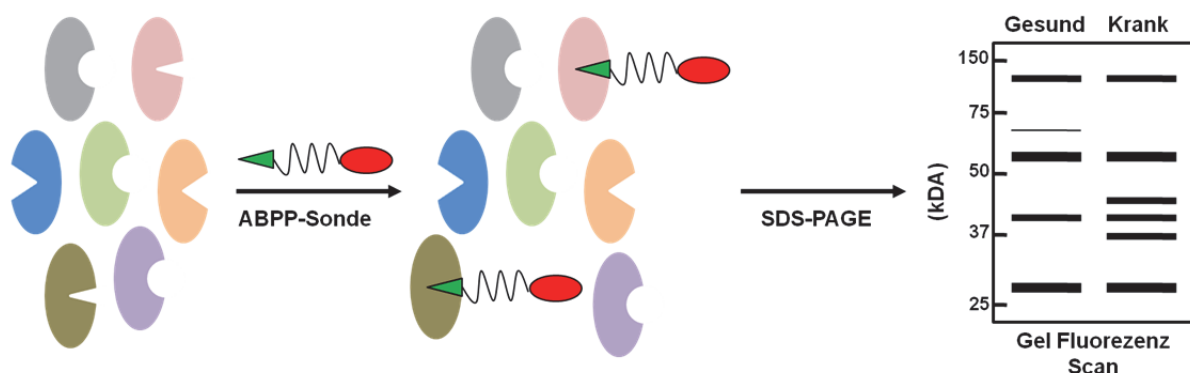
Phosphor-Bindung zu einem Amid führt. Dementsprechend kann die Staudinger-Ligation wie auch die Klick-Chemie für 2-Schritt-ABPP eingesetzt werden <sup>[57]</sup>.

Ein Vergleich des ABPP mit „Minimal-Reporter“-ABPs und „klassischen“ Reporter-ABPs zeigt, dass diese oftmals zu unterschiedlichen Aktivitätsprofilen führen. Dabei geht man davon aus, dass *in vivo* gewonnene Aktivitätsprofile der „biologischen Realität“ mehr entsprechen, da die Messungen des funktionellen Proteoms in einer native, zellulären Umgebung durchgeführt werden <sup>[30, 54-55]</sup>.

### 1.3.1.2 Anwendungen des ABPP

#### Vergleichendes Profiling

Ein möglicher Ansatz der Durchführung von ABPP-Experimenten ist das vergleichende Profiling. Bei diesem Verfahren werden mittels ABPP Enzymaktivitäten von verschiedenen Proteomproben, welche z.B. aus einem gesunden bzw. erkrankten Organismus gewonnen wurden, verglichen (Abb. 6) <sup>[58]</sup>. Dieser Ansatz wird daher häufig zur Identifizierung neuer Proteintargets für eine therapeutische Intervention angewendet <sup>[17-18]</sup>.

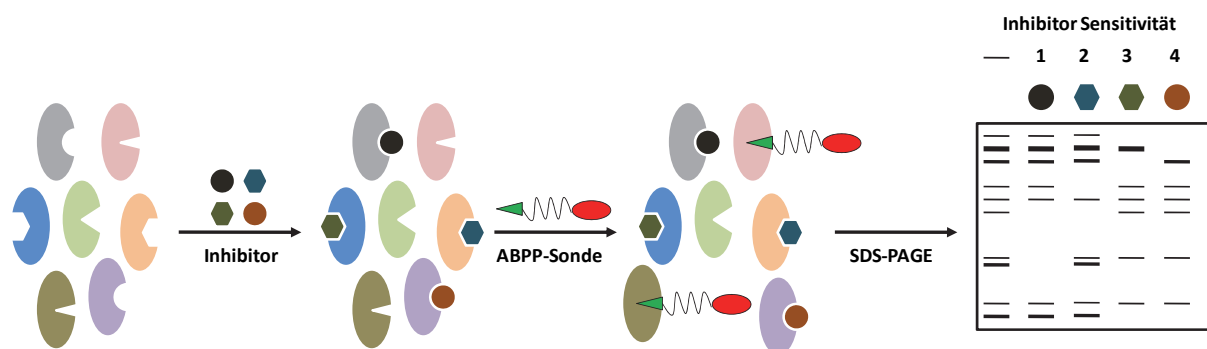


**Abb. 6:** Gel-basiertes vergleichendes ABPP: Enzymaktivitäten aus unterschiedlichen Quellen (hier z.B. aus Proteinlysaten von gesunden und kranken Organismen) werden mittels ABP-Markierung von aktiven Enzymen und anschließender Detektion durch einen in-Gel Fluoreszenzscan visualisiert. Der Vergleich der erhaltenen Aktivitätsmuster erlaubt somit Rückschlüsse auf krankheitsspezifische Enzymaktivitäten (modifiziert nach <sup>[17]</sup>).

## Einleitung

### Kompetitives Profiling

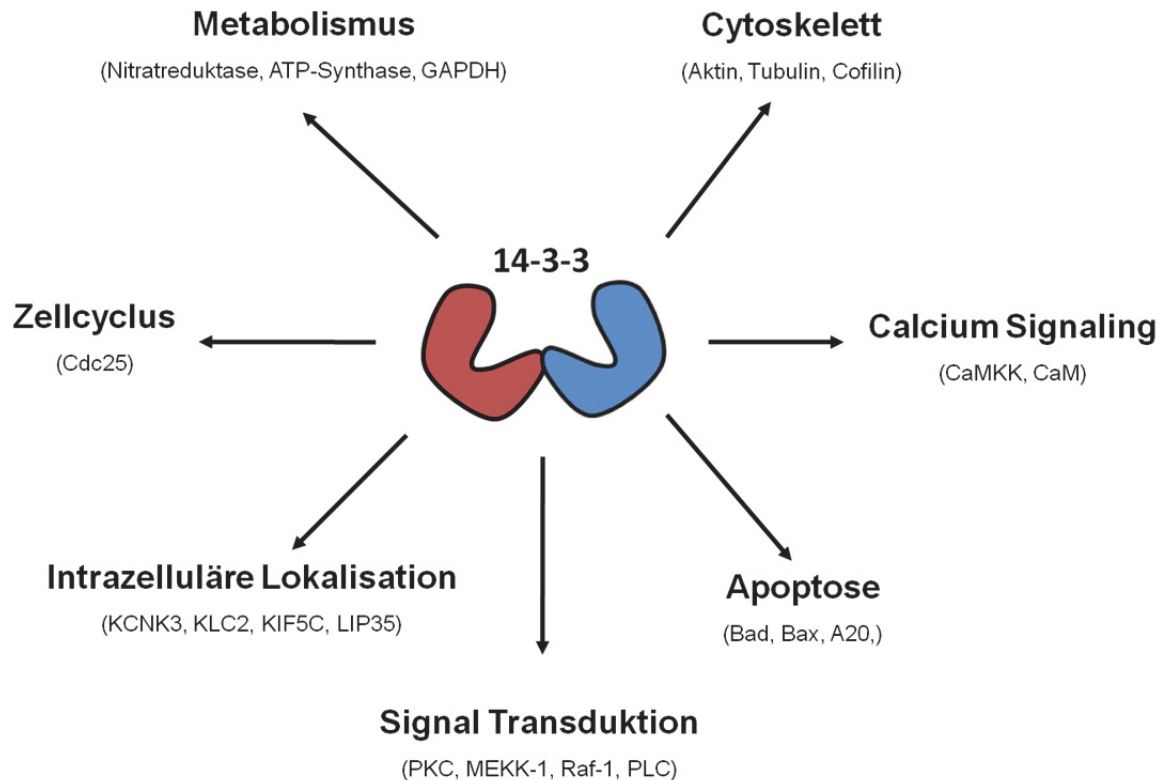
Ein Alternativ-ABPP-Verfahren ist das kompetitive Profiling (Abb. 7). Diese Methode kann unter anderem zur Entdeckung potenter und selektiver Inhibitoren von Enzymen eingesetzt werden [17, 59]. Um die Identifizierung von selektiven niedermolekularen Verbindungen als Inhibitoren eines bestimmten Enzyms zu ermöglichen, wird ein Konkurrenzexperiment durchgeführt. Hierzu werden die zu untersuchenden, biologischen Proben zuerst mit chemischen Verbindungen inkubiert, anschließend werden die ABPs zum Experiment hinzugegeben. Binden die zu untersuchenden Verbindungen an die gleiche Bindestelle wie die ABPs, wird das Markieren durch die ABPs unterdrückt (daher der Name kompetitives Profiling). Das „Verschwinden“ einer ABP-Markierungsbande weist somit also auf das Vorhandensein eines Inhibitors hin. Der Vorteil dieser Methode im Vergleich zu konventionellen Inhibitorscreenings besteht darin, dass die Experimente mit Enzymen im nativen Proteom durchgeführt werden können und somit in einem biologisch-relevanten Milieu gemessen werden [17]. Des Weiteren ist es mit ABPP möglich, die Effekte einer Substanz in einem Experiment gegen eine Vielzahl von Enzymen zu testen, so dass in einer Messung sowohl Aussagen zur Potenz als auch Selektivität der Verbindungen möglich sind [18, 47, 59]. Dieses Verfahren wurde z.B. genutzt, um selektive Inhibitoren ausgewählter Serin Hydrolasen zu identifizieren [12, 60].



**Abb. 7:** Kompetitives ABPP zur Auffindung von potenten und selektiven Inhibitoren ausgewählter Enzyme. Das Proteom wird mit den zu testenden Substanzen vorinkubiert. Anschließend wird durch Zugabe der ABPs die Potenz und Selektivität der getesteten Substanzen visualisiert (modifiziert nach [17]).

### 1.4 14-3-3 - Proteine

Die 14-3-3 Proteine bilden eine Familie von stark konservierten, sauren Proteinen mit einem Molekulargewicht von ca. 30 kDa. Sie wurden erstmals 1967 von Moore und Perez in einer systematischen Analyse von Gehirnproteinen beschrieben <sup>[61]</sup>. Der Name 14-3-3 leitet sich aus der Nummer der Fraktion nach der DEAE-C (Diethylaminoethyl-Zellulose)-Chromatographie und der Position in der nachfolgenden Gelelektrophorese ab <sup>[62]</sup>. Ursprünglich wurde ihre Wichtigkeit nicht erkannt, bis Sie als Aktivatoren der Tyrosin- und Tryptophan-Hydroxylasen <sup>[63]</sup> sowie als Inhibitoren der Proteinkinase C und als Aktivator von Raf identifiziert wurden <sup>[64-67]</sup>. Heute sind 14-3-3 Proteine als eine Gruppe multifunktionaler Proteine bekannt, die als Adapterproteine mit einer Vielzahl von Proteinen Interaktionen eingehen und somit deren Funktion beeinflussen. Die 14-3-3-Proteine binden dabei insbesondere phosphorylierte Peptidsequenzen und spielen daher eine große Rolle in Signaltransduktionswegen, welche häufig über reversible Phosphorylierungen reguliert werden. „Klassische“, durch 14-3-3-Proteine regulierte, biologische Prozesse sind z.B. neuronale Entwicklungsprozesse, die Kontrolle des Zellwachstums und virale und bakterielle Pathogenese <sup>[62]</sup>. In der Tat sind 14-3-3 Proteine an der Regulation einer großen Anzahl zellulärer Prozesse beteiligt <sup>[68-71]</sup>. Durch ihre Bindung an unterschiedliche Interaktionspartner regulieren Sie beispielsweise den Zellzyklus, verschiedene Signaltransduktionswege, Apoptose, die Stressantwort einer Zelle, die Organisation des Cytoskeletts, Stoffwechsel und Tumorstadium (Abb. 8). So waren im Jahr 2005 bereits ca. 200 potentielle 14-3-3 Bindeproteine in verschiedenen Organismen bekannt <sup>[72]</sup>.

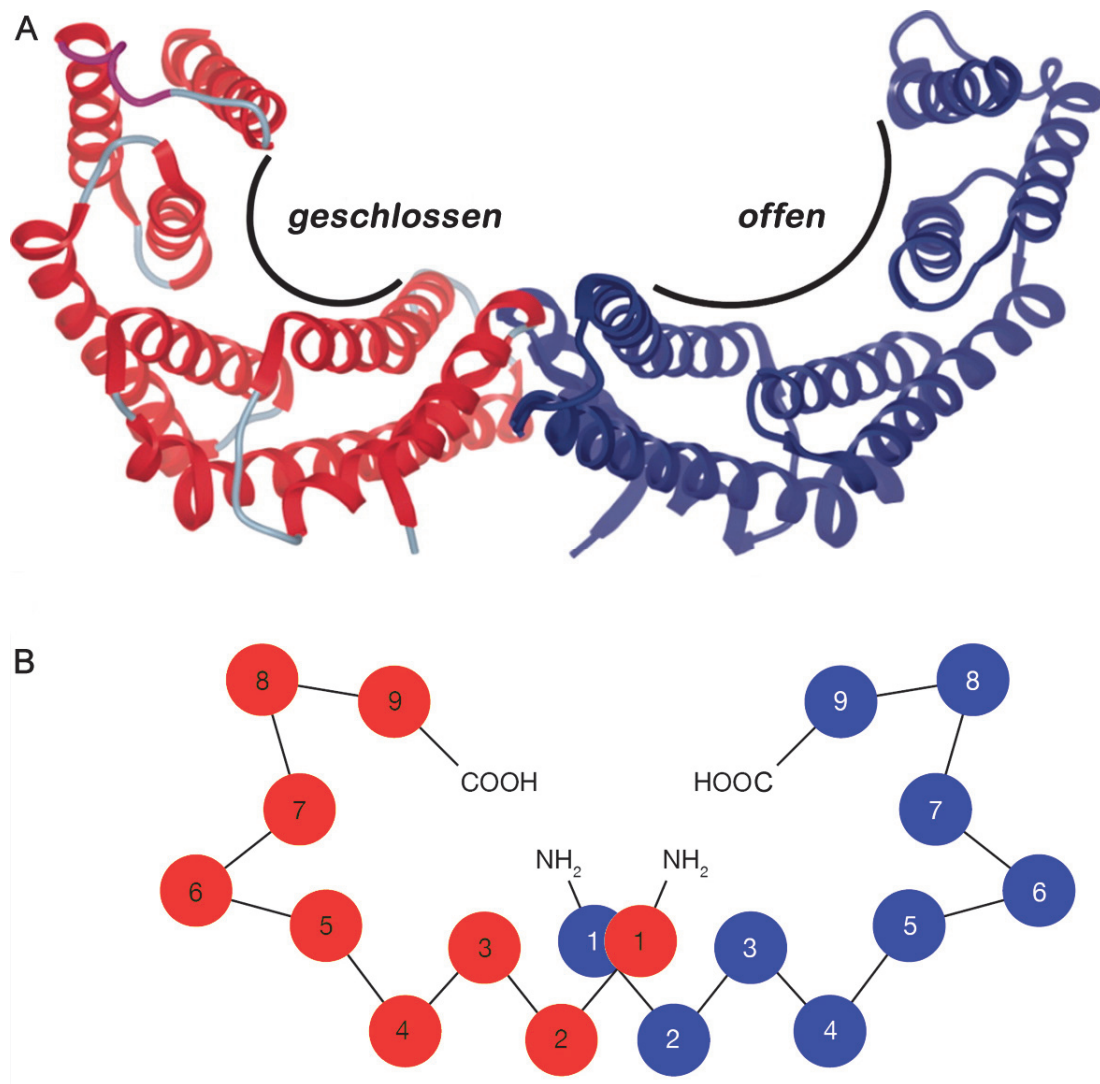


**Abb. 8:** Übersicht über die Beteiligung von 14-3-3 Proteinen an verschiedenen Signalwegen (modifiziert nach <sup>[72]</sup>).

Die verschiedenen Mitglieder der 14-3-3 Proteinfamilie sind dabei hoch-homolog und werden in den meisten Geweben exprimiert. Sie finden sich ubiquitär in allen bislang untersuchten, eukaryotischen Organismen. In den eukaryotischen Zellen sind die meisten 14-3-3-Proteine im Cytoplasma lokalisiert, gelegentlich befinden sich diese jedoch auch in anderen Bereichen wie z.B. der Plasmamembran oder andere intrazellulären Organellen wie dem Nucleus und Golgi-Apparat <sup>[65, 73-76]</sup>. Die Anzahl der Isoformen variiert in Abhängigkeit vom Organismus. In Hefe, *Drosophila melanogaster* (schwarzbäuchige Taufliege) und *Caenorhabditis elegans* (Fadenwurm) sind 2 Isoformen bekannt, in Säugetieren bis zu 7 Isoformen und 12 Isoformen findet man in Arabidopsis <sup>[62, 77-78]</sup>. Beim Menschen finden sich 7 Isoformen ( $\beta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\eta$ ,  $\sigma$ ,  $\tau$ ,  $\zeta$ ) <sup>[63, 79]</sup>, von denen die beiden ursprünglich als  $\alpha$  und  $\delta$  bezeichneten Spezies in die phosphorylierten Formen  $\beta$  und  $\zeta$  umbenannt wurden <sup>[80]</sup>.

### **1.4.1 Struktur und Funktion von 14-3-3 Proteinen**

14-3-3-Proteine sind dimere Proteine. Ein 14-3-3-Monomer ist aus einem Bündel von 9  $\alpha$ -Helices aufgebaut, welche in antiparalleler Weise angeordnet sind <sup>[62, 77]</sup>. Das Monomer hat dabei eine „tassenartige“ Form mit einer hoch-konservierten Oberfläche <sup>[62, 81-82]</sup>. So sind in der amphipathischen Tasche, in welcher die Proteinpartner gebunden werden, 50 % der Aminosäuren zwischen den einzelnen Isoformen konserviert <sup>[77]</sup>. Über die Interaktion ihrer N-Termini bilden die Monomer dann die charakteristische 14-3-3-Dimer-Struktur aus <sup>[81-82]</sup>. Dabei sind sowohl Homo- als auch Heterodimere bekannt. So bilden die Mitglieder 14-3-3 $\sigma$  und 14-3-3 $\tau$  bevorzugt Heterodimere aus, währenddessen die Isoform 14-3-3 $\epsilon$  eine Homodimerisierung bevorzugt. Die dimere Grenzfläche wird dabei durch eine Bindung der  $\alpha$ 1-Helix von Monomer 1 gegen die  $\alpha$ 2- und  $\alpha$ 3-Helix von Monomer 2 geformt, was zu einem etwa 6 - 8 Å großen Loch in der Mitte führt <sup>[62]</sup>. Der 14-3-3 Dimer bildet einen großen, negativ geladenen Kanal aus, dessen Boden aus den geladenen und polaren Helices 1, 3 und 5 gebildet wird, während die Wände des Kanals aus den hydrophoben Helices 7 und 9 bestehen (Abb. 9) <sup>[62, 82]</sup>.



**Abb. 9:** Schematische Darstellung eines 14-3-3 Dimers. **(A)** Kristallstruktur der apo-β Isoform mit Blick auf die Peptid-Bindungstaschen, welche sowohl offen als auch geschlossen für die jeweiligen Monomere (rot und blau) dargestellt sind. **(B)** Schematische Darstellung der neun anti-parallelen α-Helices eines jeden Monomers (rot und blau) (modifiziert nach [72, 83]).

Viele 14-3-3-Liganden binden mit vergleichbarer Affinität an alle Isoformen. Die Bindung erfolgt dabei in der konservierten, amphipathischen Tasche der 14-3-3-Proteine [81]. Dabei binden überwiegend phosphorylierte Proteine in die amphipathische Tasche. Allerdings sind auch Protein-Protein-Interaktionen mit nicht-phosphorylierten Proteinen bekannt. Die Bindung der Peptidsequenzen in der amphipathischen Tasche erfolgt dabei in einer gestreckten Konformation, wodurch eine große Bandbreite unterschiedlicher Ligandensequenzen an die Binderegion andocken können [62]. Aufgrund des dimeren Charakters können 14-3-3-Proteine gleichzeitig zwei Zielproteine binden [62, 84]. Alternativ kann auch ein Protein mit zwei



## Einleitung

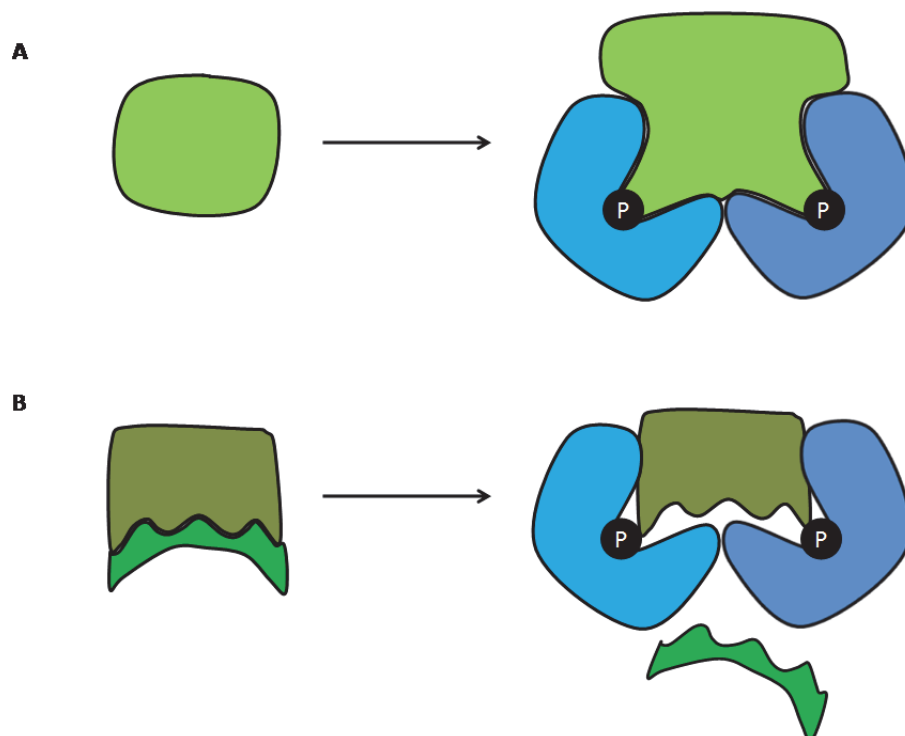
14-3-3 Bindemotiven gebunden werden, dieses wird dann mit einer 30-mal höheren Affinität gebunden <sup>[85]</sup>.

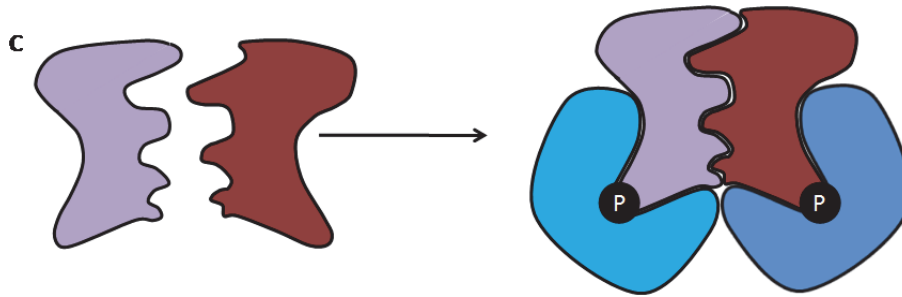
14-3-3-Proteine binden die meisten ihrer Interaktionspartner in Abhängigkeit von deren Phosphorylierungsmustern. Die 14-3-3-Proteine interagieren mit phosphorylierten Serin- oder Threoninresten innerhalb eines konservierten Bindemotivs. Zwei bekannte Bindemotive sind die Sequenz -RSXpS/pTXP- bzw. -RXXXpS/pTXP-, wobei R = Arginin, S = Serin, X = eine beliebige Aminosäure, pS = Phosphoserin, pT = Phosphothreonin und P = Prolin ist. pT kann pS dabei jederzeit ersetzen <sup>[85-87]</sup>. Der Argininrest an Position -3 bzw. -4 sowie der Prolinrest an Position +2, ausgehend vom phosphorylierten Serin/Threonin, ist dabei wichtig, aber nicht essentiell für die Bindung <sup>[87]</sup>.

### 1.4.2 Biologische Funktion von 14-3-3 Proteinen

14-3-3 Proteine verfügen über drei wichtige Funktionen in der Zelle (Abb. 10) <sup>[77]</sup>:

- i) Induktion von Konformationsänderungen im gebundenen Protein
- ii) physischer Einschluss von sequenzspezifischen oder strukturellen Funktionen
- iii) Colokalisierung von Proteinen



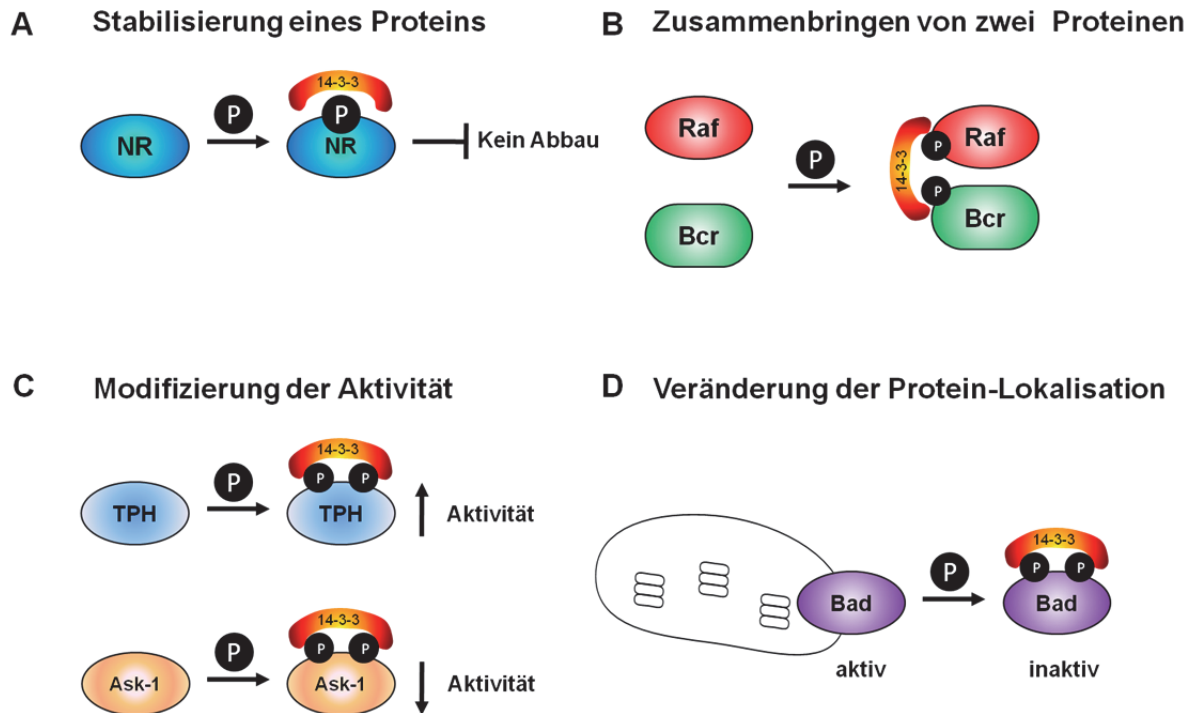


**Abb. 10:** Strukturelle Effekte der 14-3-3 Bindung. **(A)** Konformationelle Änderung im Protein Target. **(B)** Maskierung einer speziellen Region des Targets. **(C)** Colokalisierung von zwei Proteinen (modifiziert nach <sup>[77]</sup>).

Interessanterweise ist jedoch bisher wenig darüber bekannt, wie 14-3-3 Proteine selbst reguliert sind. So sind die meisten 14-3-3 Isoformen in allen Gewebearten exprimiert mit der Ausnahme von 14-3-3 $\sigma$ , das eine stärker beschränkte Expression aufweist <sup>[88]</sup>.

Die Interaktion von 14-3-3 Proteinen mit ihren Interaktionspartnern hat nicht nur strukturelle Auswirkungen (Abb. 10), sondern reguliert auch deren biologische Funktion (Abb. 11) <sup>[70]</sup>. Eine Bindung von 14-3-3 an das Zielprotein kann dieses z.B. vor proteolytischem Abbau schützen <sup>[89]</sup>. Durch ihre dimere Natur können 14-3-3 Proteine auch als Adapter dienen und zwei verschiedene Zielproteine durch gleichzeitiges Binden in räumliche Nähe zueinanderbringen, wie z. B. bei dem Raf-Bcr-Proteinkomplex <sup>[90]</sup>. Des Weiteren kann die Bindung von 14-3-3 eine Änderung der Enzymaktivität des Bindepartners induzieren. Die Tryptophan-Hydroxylase wird beispielsweise durch 14-3-3 Bindung aktiviert <sup>[63]</sup>, während eine Bindung der *Apoptosis Signal-regulating Kinase 1* eine Aktivitätsminderung bewirkt <sup>[91]</sup>. Eine weitere Regulationsmöglichkeit besteht in der Veränderung der intrazellulären Lokalisation von Zielproteinen durch die Bindung an 14-3-3. Beispiele hierfür sind das pro-apoptotische Protein Bad, ein Mitglied der Bcl-2-Familie, sowie FKHRL1 (*forkhead transcription factor*), welcher nach Phosphorylierung und Bindung an 14-3-3 im Zytoplasma zurückgehalten wird, wodurch die Gentranskription reguliert wird <sup>[62]</sup>.

## Einleitung



**Abb. 11:** Verschiedene Arten der Regulation von Interaktionspartnern durch 14-3-3. **(A)** Stabilisierung des 14-3-3 Bindeproteins durch die Bindung von 14-3-3 <sup>[89]</sup>. **(B)** Durch gleichzeitige Bindung an zwei Zielproteine kann ein 14-3-3 Dimer diese in räumliche Nähe zueinander bringen <sup>[90]</sup>. **(C)** Modifizierung der Aktivität der Zielproteine durch 14-3-3 Bindung <sup>[63, 91]</sup>. **(D)** Änderung der Lokalisation eines Bindepartners in der Zelle durch 14-3-3 <sup>[62]</sup> (modifiziert nach <sup>[72]</sup>).

### 1.5 Protein-Protein-Wechselwirkungen und deren niedermolekulare Modulation

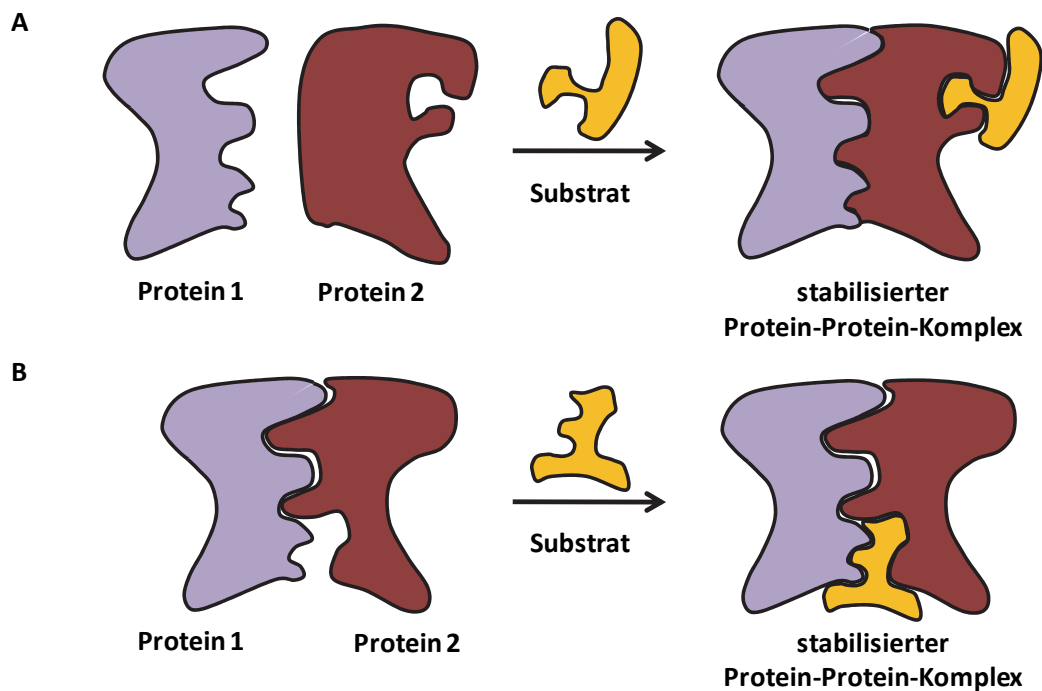
Die Interaktion der 14-3-3-Proteine mit ihren Bindeproteinen ist nur eine von vielen Protein-Protein-Wechselwirkungen, die in lebenden Zellen vorkommen. PPIs sind in allen lebenden Organismen von übergeordneter Bedeutung. Die Assoziation zellulärer Proteine in funktionale Proteinkomplexe sowie deren Dissoziation sind äußerst dynamische Prozesse, die von verschiedenen, zellulären Mechanismen reguliert werden <sup>[92]</sup>. Die Gesamtheit der PPIs im Organismus bildet dabei ein großes und komplexes Netzwerk, das sogenannte Interaktom, aus und trägt zur Regulation und Ausführung der meisten biologischen Prozesse bei. Die Größe des menschlichen Interaktoms umfasst etwa 130.000 PPIs, von denen aber bislang nur etwas 8% genau bekannt sind <sup>[93]</sup>. Generell werden bei Protein-Protein-Wechselwirkungen zwei Arten von Komplexen beobachtet: (a) Homo-Interaktionen zwischen gleichen Proteinen (Bildung von Homokomplexen) und (b) Hetero-Interaktionen zwischen zwei verschiedenen Proteinen (Bildung von Heterokomplexen) <sup>[94]</sup>. Die Assoziation von Proteinen erfolgt dabei häufig durch hydrophobe Stellen auf ihren Oberflächen, seltener durch polare Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten.

Aufgrund der immensen Bedeutung der Protein-Protein-Interaktionen in nahezu allen biologischen Prozessen gewinnt die Hemmung oder Stabilisierung von PPIs mit niedermolekularen Verbindungen in der pharmazeutischen Forschung zunehmend an Interesse und bietet neue Therapiemöglichkeiten für Krankheiten <sup>[95]</sup>. Dabei unterscheidet man zwischen PPI-Inhibitoren und Stabilisatoren. Während Inhibitoren von PPIs heutzutage etabliert sind, ist das Konzept der Stabilisierung von Protein-Protein-Interaktionen noch relativ neu. In vielen biologischen Zusammenhängen kann eine längere Lebensdauer von bestehenden PPIs biologisch-nutzbare Effekte hervorrufen <sup>[96]</sup>. Dabei sind aufgrund ihrer besseren pharmakologischen Eigenschaften insbesondere niedermolekulare *drug-like* Verbindungen als PPI-Stabilisatoren von pharmazeutischem Interesse.

Niedermolekulare PPI-Stabilisatoren können dabei über zwei prinzipielle Mechanismen agieren (Abb. 12): (a) Die Affinität der Proteinpartner zueinander wird in allosterischer Weise durch die Bindung eines niedermolekularen Wirkstoffes an einen einzelnen Partner erhöht. (b) Ein niedermolekularer Wirkstoff bindet am Rand der PPI-Kontaktfläche in einer gemeinsam gebildeten Bindetasche der

## Einleitung

wechselwirkenden Proteine, wodurch ebenfalls die Bindungsaffinität zwischen den beiden Proteinen erhöht wird. Zu den bekanntesten allosterischen PPI-Stabilisatoren gehören niedermolekulare Modulatoren der Mikrotubuliassoziation. Ein Beispiel für den zweiten Mechanismus ist die Interaktion des Naturstoffes Fusicoccin A mit 14-3-3-Proteinen und seinen Bindepartnern <sup>[96]</sup>.



**Abb. 12:** Direkte PPI-Stabilisierung durch niedermolekulare Verbindungen. **(A)** Durch die Bindung der niedermolekularen Verbindung kommt es zu einer Konformationsänderung, welche die Bindung mit einem zweiten Protein begünstigt. **(B)** Erhöhung der Affinität der Proteinpartner durch Bindung der niedermolekularen Verbindung und Ausbildung eines ternären Komplexes.

So bewirkt der direkte PPI-Stabilisator Fusicoccin A (FCA), ein Diterpenglycosid des Pilzes *Phomopsis amygdali*, ein Welken von Pflanzen <sup>[97]</sup>. Dieses wird durch die Stabilisierung einer Protein-Protein-Interaktion zwischen der regulatorischen Einheit der Plasmamembran  $H^+$ -ATPase (PMA) und 14-3-3 Adapterproteinen als primären Rezeptor hervorgerufen <sup>[98]</sup>. FCA bindet dabei an den Rand der Kontaktfläche dieses Komplexes und verstärkt so die Bindungsaffinität um den Faktor 90 <sup>[99]</sup>. FCA belegt dabei mehrheitlich eine hydrophobe Bindungstasche am Rand der Kontaktfläche beider Proteine. Das Terpensystem liegt tief vergraben in einer trichterförmigen Tasche, die vom 14-3-3-Protein und dem PMA-C-Terminus gebildet wird <sup>[100]</sup>. Die Stabilisierung führt zu einer Aktivierung der Protonenpumpe und so zu einer Öffnung

## **Einleitung**

---

der Stomata, den Gasaustauscherporen auf den Blättern einer Pflanze, so dass die Pflanzen schließlich zu welken beginnen <sup>[101-102]</sup>.

Leider sind bisher nur wenige, chemotherapeutisch nutzbare, niedermolekulare Stabilisatoren von PPIs bekannt. Deshalb sollten im Rahmen dieser Arbeit weitere niedermolekulare PPI-Modulatoren entwickelt werden.

### 2. Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Hauptziele verfolgt. Im ersten Teil der Arbeit sollte die Verwendbarkeit des 16-gliedrigen makrozyklischen Lactons (-)-A26771B (**1**) (Abb. 14), einem Naturstoff mit antibiotischen Eigenschaften, evaluiert werden. Dieser Naturstoff basiert auf einem Michael-System, welches prinzipiell bioreaktiv ist. Somit könnten Derivate, in welchen eine Reportergruppe an dem Naturstoff angebracht wurde, potentielle ABPs für ABPP-Ansätze darstellen. Um diese Hypothese zu überprüfen, sollte eine Totalsynthese des Naturstoffes entwickelt werden, welche nicht nur die Synthese der unmodifizierten Verbindung, sondern zeitgleich auch eine einfache und gut handbare Modifizierung des Naturstoffes zu einer Sonde zulässt. In den letzten Jahren wurden zwar schon vielfach verschiedene Syntheserouten für die Synthese von (-)-A26771B (**1**) entwickelt und veröffentlicht [103-110], hier sollte aber erstmals eine Synthese entworfen werden, in welcher der kritische Ringschluss durch eine ringschließende Metathese durchgeführt werden sollte. Ein solcher Ansatz ist zur Totalsynthese von (-)-A26771B (**1**) bisher noch nicht verwendet worden. In einem zweiten Schritt sollten dann erstmals die Proteom-markierenden Eigenschaften dieses Naturstoffes mit der Hilfe von ABPP evaluiert werden, da mit Hilfe dieser Methode eine Analyse der Target-Proteine dieses Naturstoffes und somit ein Rückschluss auf den Wirkmechanismus dieser Substanz erstmals möglich wird.

Aufbauend auf der zu etablierenden, neuen Synthesemethode für das 16-gliedrige Makrolid (-)-A26771B (**1**) sollten auch drei Mitglieder der Cladospoliden-Familie synthetisiert werden. Die Cladospolide B, C und D (**25 - 27**, Abb. 38) sind im Gegensatz zu (-)-A26771B 12-gliedrige, makrozyklische Lactone, welche aber trotz der geringeren Ringgröße insgesamt eine sehr ähnliche Grundstruktur aufweisen. Aufgrund dessen sollte die Anwendbarkeit der, für das Antibiotikum **1** etablierten, Syntheseroute auf die Synthese der drei Cladospoliden B (**25**), C (**26**) und D (**27**) überprüft und hier im Anschluss, ebenfalls mittels modifizierter, chemischer Sonden, die Protein-Targets dieser Naturstoffe identifiziert werden.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit sollten dann niedermolekulare Verbindungen, welche als Modulatoren, d.h. Stabilisatoren oder Inhibitoren, von 14-3-3 Protein-Protein Wechselwirkungen wirken, entwickelt werden. Hierzu wurden verschiedene

## Zielsetzung

---

Ansätze verfolgt. Im ersten Ansatz wurde auf die Arbeiten der Arbeitsgruppe Yao zurückgegriffen <sup>[111]</sup>. Diese veröffentlichten 2012 einen zellgängigen Protein-Protein-Interaktions-Inhibitor (**47**, Abb. 45) der als Pan-Inhibitor aller 14-3-3-PPIs wirkt. Eine anschließend in der AG Ottmann durchgeführte Kristallstrukturanalyse des 14-3-3 – Inhibitor-Komplexes offenbarte dann, dass eine elektrophile Modifikation am N-terminalen Ende des Inhibitors die Möglichkeit bieten könnte, mit einem beweglichen Aspartat-Rest der 14-3-3-Proteine eine kovalente Bindung auszubilden. Um diese Hypothese zu überprüfen, sollten daher im Rahmen der Arbeit solche kovalente Inhibitoren wie z. B. die Verbindung **40** (Abb. 45), die auf einer elektrophilen 2-Phenylepoxid-Einheit basiert, entwickelt und synthetisiert, und anschließend auf ihre biologischen Eigenschaften untersucht werden.

In einem nächsten Teilprojekt sollten dann 14-3-3 Fusicoccin-Derivate als Modulatoren von 14-3-3/C-RAF Protein-Protein-Wechselwirkungen synthetisiert und getestet werden. Der Ras-RAF-MAPK-Signalweg ist bei vielen Krebsarten und einigen Entwicklungsstörungen überaktiv. Zur C-Raf-Aktivierung ist dabei eine Rekrutierung an die Plasmamembran notwendig <sup>[112]</sup>. Eine Bindung an 14-3-3 Proteine hingegen stört die Ras-C-RAF Interaktion und kann somit zu einer Hemmung der Ras-vermittelten Aktivierung von C-RAF an der Plasmamembran führen. Um eine stärkere Stabilisierung des 14-3-3/C-RAF Komplexes zu erhalten, sollte dementsprechend eine kleine Bibliothek von niedermolekularen Verbindungen auf der Basis des Ringes A von Fusicoccin A (FCA) synthetisiert und ihre stabilisierende Wirkung bei 14-3-3/C-RAF Komplexen untersucht werden.

Des Weiteren sollten zellgängige Derivate eines 14-3-3 Inhibitors, welche die Interaktion von 14-3-3 und ExoS hemmen, im Rahmen dieser Arbeit dargestellt werden. Die in einer Vorarbeit aufgefundenen Inhibitoren basierten dabei auf einem (2-(2-Amino-2-oxoethoxy)phenyl)phosphosäure Grundgerüst und sollten durch chemische Derivatisierung in eine geeignete Prodrug überführt werden.

Im letzten Teil dieser Arbeit sollten stabilisierende Fragmente der 14-3-3 - MLF1 – Interaktion aufgefunden werden. Durch eine Stabilisierung der 14-3-3/MLF1 Protein-Protein Wechselwirkung könnte der MLF1-vermittelte Signalweg unterbunden werden, was zur chemotherapeutischen Behandlung verschiedener Krankheiten wie der akuten Myeloid-Leukämie und dem Myelodysplastisches Syndrom nützlich sein könnte. Um dieses Ziel zu erreichen, wurden Derivate der Verbindung 3-Pyrrolidionol



## **Zielsetzung**

---

(78) hergestellt, welche in Vorarbeiten als möglicher Stabilisator der 14-3-3 - MLF1 – PPI bereits identifiziert werden konnte. Dabei sollten durch zielgerichtete Derivatisierung dieser Leitstruktur stärker stabilisierende und spezifisch-agierende Fragmente aufgefunden werden.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

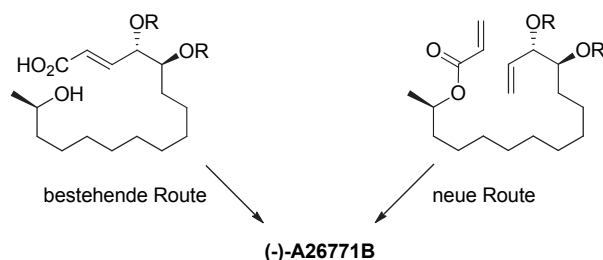
#### 3.1 Synthese, Derivatisierung und biologische Untersuchung von (-)-A26771B

Der Naturstoff (-)-A26771B (**1**) ist ein sechszehn-gliedriges, makrozyklisches Lacton mit antibiotischer Wirkung, welches in der Natur durch den Pilz *Penicillium turbatum* produziert wird. Das Antibiotikum zeigt moderate Aktivität gegen gram-positive Bakterien, Mycoplasmen und Pilze. Hingegen ist es inaktiv z.B. gegen *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* oder verschiedene Salmonellenarten (getestet bei 100 µg/mL mit der Agerdilutionsmethode) <sup>[113]</sup>.

Da in dem Naturstoff (-)-A26771B zwei hochreaktive elektrophile Zentren enthalten sind (in der Form eines „doppelten“ Michael-Systems) war es für diese Arbeit von Interesse, mit Hilfe eines chemischen Proteomik-Ansatzes (in Analogie zu einem aktivitätsbasierten Screening) die biologisch-relevanten Zielmoleküle dieser Substanz zu bestimmen. Hierfür sollte dementsprechend eine Syntheseroute des Naturstoffes etabliert werden, welche später eine einfache Derivatisierung zu einer aktivitätsbasierten Sonde für einen Pulldown-Targetidentifizierungsansatz zulässt. Anders als in bereits bestehenden Syntheserouten <sup>[103-110]</sup>, welche hauptsächlich den Ringschluss über eine Macrolactonisierung oder über Palladium-katalysierte Reaktionen verwirklichen, sollte in dieser Arbeit eine Syntheseroute mittels einer ringschließenden Metathese (*ring closing metathesis*, RCM) als Schlüssel-Cyclisierungsschritt entwickelt werden (Abb. 13). Zu beachten ist: obwohl bereits eine Synthese von (-)-A26771B mit einer Metathese als Reaktionsschritt in der Literatur beschrieben wurde <sup>[114]</sup>, verläuft bei dieser Reaktion der Ringschluss über eine Macrolactonisierung; die Synthese über eine RCM stellt also ein Novum zur Synthese dieses Naturstoffes dar.

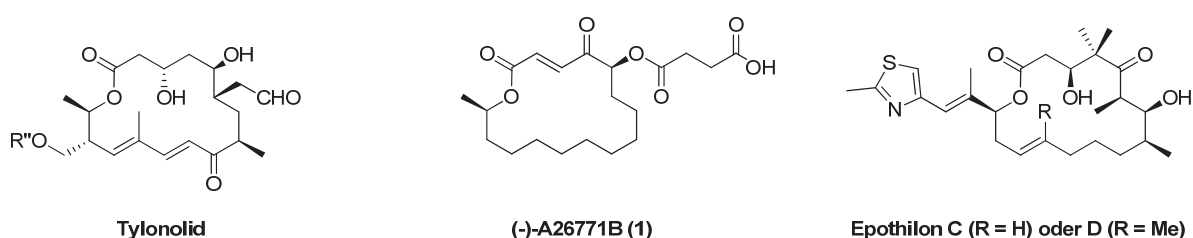
Die Syntheseroute sollte dabei so etabliert werden, dass mittels einer gemeinsamen Synthesestrategie sowohl der Naturstoff (-)-A26771B als auch mögliche Derivate für die anschließenden biologischen Tests ohne großen Mehraufwand synthetisiert werden können. Mögliche Derivatisierungen sollten hierbei sowohl an der Seitenkette und somit nach „Abschluss“ der Synthese, als auch während der Synthese am Ringsystem möglich sein.

## Ergebnisse und Diskussionen



**Abb. 13:** Zwei Intermediate für die Synthese von (-)-A26771B.

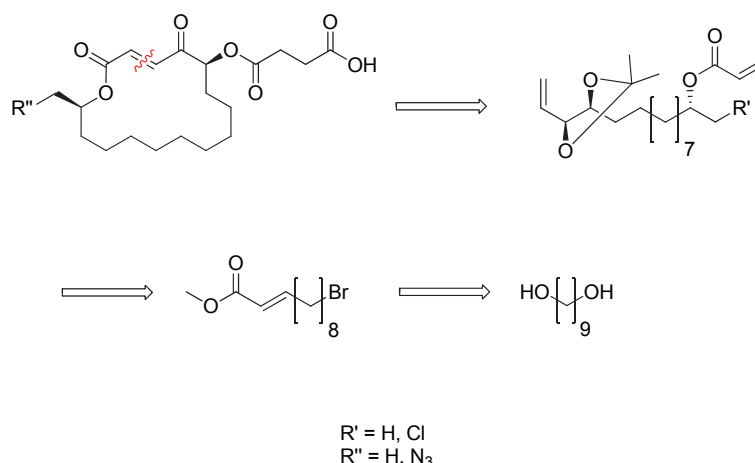
Die strukturelle Einheit, der 16-gliedrige Makrozyklus des Naturstoffes (-)-A26771B (**1**), findet sich dabei ebenfalls in anderen, biologisch-aktiven Naturstoffen wie z.B. Tylonolid oder auch den Epothilonen (Abb. 14) <sup>[115]</sup>.



**Abb. 14:** Verschiedene biologisch-aktive, 16-gliedrige Makrolide.

Die retrosynthetische Analyse des Naturstoffes zeigt, dass eine Ringöffnung an der Doppelbindung, welche im Umkehrschluss mittels einer ringschließenden Metathese geschlossen werden kann, zu einem linearen Fragment führt, in welchem bereits alle Stereozentren definiert sind (Abb. 15). Diese können durch eine Sharpless-Dihydroxylierung eines  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Esters bzw. dem Einsatz isomerenreiner Reagenzien in das Zielmolekül eingeführt werden. Dieses lineare Fragment lässt sich dann weiter in einen Methylester zerlegen, welcher letztendlich aus dem kommerziell erhältlichen Ausgangsmaterial 1,9-Nonandiol synthetisiert werden kann. Aus der retrosynthetischen Analyse wird auch ersichtlich, dass eine Derivatisierung des Ringsystems bereits während der Synthese durchgeführt werden kann, so dass am Ende entweder der Naturstoff, oder analog hierzu, ein Derivat synthetisiert werden kann (Abb. 15).

## Ergebnisse und Diskussionen

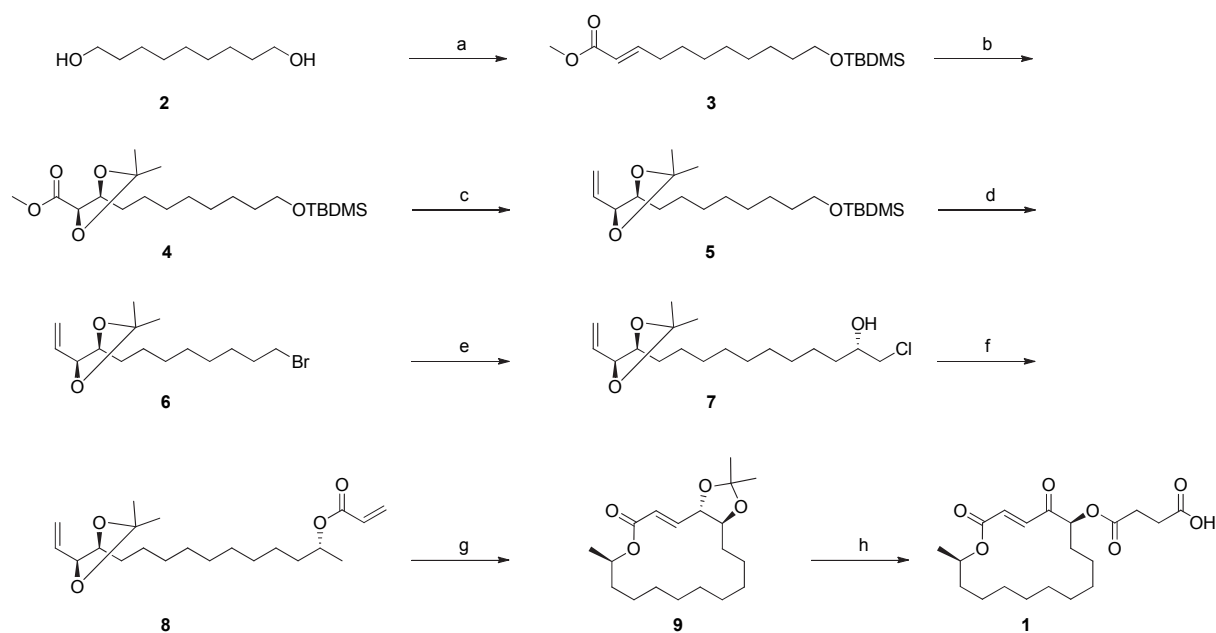


**Abb. 15:** Retrosynthese von (-)-A26771B ( $R', R'' = H$ ) und  $N_3$ -(-)-A26771B ( $R' = Cl, R'' = N_3$ ).

Die anfängliche Syntheseroute des Naturstoffes (-)-A26771B (**1**) bestand darin, das 1,9-Nonadiol (**2**) an einer Hydroxylgruppe mit einer Silylschutzgruppe, der *tert*-Butyldimethylsilyl-Gruppe, zu schützen, so dass der freie Alkohol in der darauffolgenden Oxidation mit Pyridiniumchlorochromat zum entsprechenden Aldehyd oxidiert werden konnte (Abb. 16). Eine Umsetzung des Aldehyds mit (Methoxycarbonylmethylen)-triphenylphosphoran in einer Wittig-Reaktion lieferte den entsprechenden Methylester. An der vorhandenen C=C Doppelbindung wurden dann in einer Sharpless-Dihydroxylierung die Alkoholgruppen an den späteren Ringpositionen (C4) und (C5) eingefügt und im darauf folgenden Schritt mit 2,2-Dimethoxypropan als Ketal geschützt. Nach einer selektiven Reduktion des Methylesters wurde in einer zweiten Grignard-Reaktion der so entstandene Aldehyd mittels Methyltriphenylphosphoniumbromid, aus welchem direkt *in situ* mit *n*-BuLi das Ylid gebildet wurde, zu einem Alken umgewandelt. Um das für die Grignard-Reaktion essentielle Halogenid zu erhalten, wurde dann die Silyl-geschützte, primäre Alkoholfunktion mit dem Reagenz Tetrabutylammoniumfluorid entschützt und in einem zweiten Schritt mittels N-Bromosuccinimid in ein Bromid umgewandelt. In der darauf folgenden Grignard-Reaktion, in welcher das benötigte Metall-Halogenid durch eine Reaktion mit aktivierten Mg-Spänen erhalten wurde, wurde stereoselektiv mit dem Einsatz von (*S*)-(+)-Epichlorohydrin die Stereochemie der freien Methylgruppe an der späteren (C15)-Position des Naturstoffes festgelegt. Der Einsatz von Epichlorohydrin hat z.B. gegenüber dem halogenfreien Propylenoxid den Vorteil, dass einerseits die für die Synthese des Naturstoffes erforderliche Methylgruppe durch eine Dehalogenierung des Chlorids mit Lithium-Aluminium-Hydrid, als auch eine spätere Derivatisierung an dieser Stelle (z.B. mit Natriumazid)

## Ergebnisse und Diskussionen

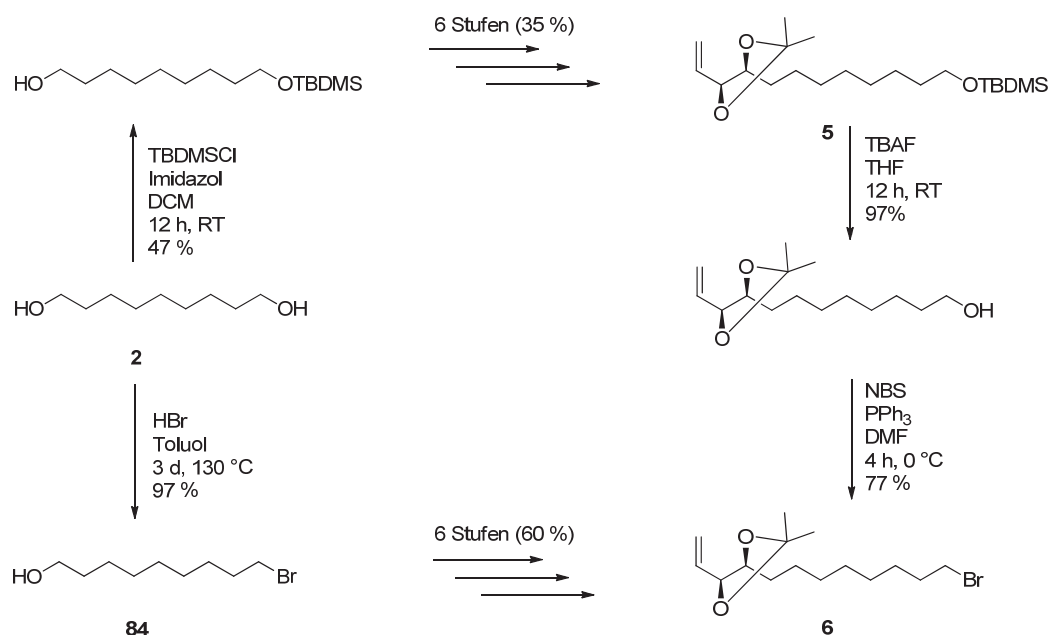
erfolgen kann. Es folgte der Ringschluss zum 16-gliedrigen Makrozyklus über die ringschließende Metathese mit einem Grubbs 2<sup>nd</sup> Generation-Katalysator, das Entschützen der Ketalgruppe durch Difluoroessigsäure, die Addition der Seitenkette mittels Bernsteinsäure-Anhydrid <sup>[116]</sup> und zuletzt die Oxidation des freien Alkohols zum Keton in einer Swern-Oxidation, wodurch die Synthese des Antibiotikums (-)-A26771B (**1**) abgeschlossen wurde.



**Abb. 16:** erste Syntheseroute zu (-)-A26771B (**1**). Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) i. TBDMSCl, Imidazol, DCM, 12 h, RT; ii. PCC, DCM, 4 h, RT; iii. Ph<sub>3</sub>PCCOOMe, DCM, 12 h, RT (38 %); (b) i. AD-Mix  $\alpha$ , <sup>t</sup>BuOH/H<sub>2</sub>O (1:1), 24 h, 0 °C; ii. Dimethoxypropan, Aceton, *p*TsOH, 50 °C, 70 min (66 %); (c) i. DIBAL-H, Toluol, 3 h, -78 °C; ii. n-BuLi, Ph<sub>3</sub>PMeBr, 12 h, RT (66 %); (d) i. TBAF, THF, 12 h, RT; ii. NBS, PPh<sub>3</sub>, DMF, 4 h, 0 °C (75 %); (e) i. Mg, 1,2-Dibromoethan, THF, 1 h, RT; ii. (S)-(+)-Epichlorohydrin, Cu(I)CN, THF, 3 h, -50 °C bis -30 °C (17 %); (f) i. LiAlH<sub>4</sub>, THF, 12 h, RT; ii. Acryloylchlorid, DCM, DIPEA, 4 h, 0 °C (88 %); (g) Grubbs 2<sup>nd</sup> Generation-Katalysator, DCM, 50 °C, 20 h (84 %); (h) i. Difluoroessigsäure/Methanol/H<sub>2</sub>O (4:3:1), 1 h, RT; ii. Bernsteinsäureanhydrid, DIPEA, DCM, 2 h, 50 °C; iii. Essigsäureanhydrid, DMSO, 20 h, 30 °C (33 %).

Die Gesamtausbeute dieser Syntheseroute (ausgehend vom 1,9-Nonandiol) liegt bei 0.51 % über 16 Stufen. Deshalb wurde in einem nächsten Schritt nach Optimierungsmöglichkeiten der Syntheseroute gesucht, welche sowohl zu einer Reduzierung der Stufen als auch zu einer Erhöhung der Gesamtausbeute führen sollte. Solche Optimierungen konnten an verschiedenen Stellen der Synthese erreicht werden, worauf nachfolgend im Detail darauf eingegangen werden soll.

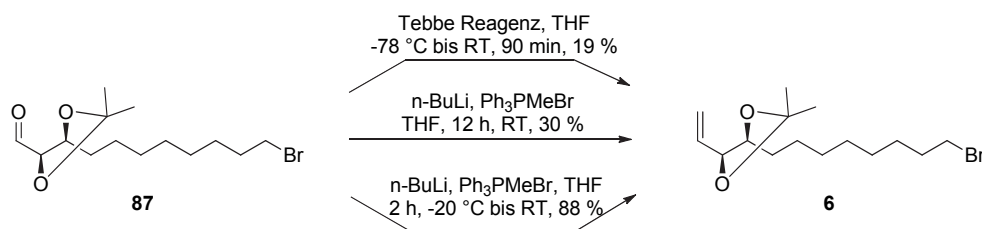
## Ergebnisse und Diskussionen



**Abb. 17:** Synthesedetail zur Darstellung der Verbindung **6** ausgehend von **2**.

In der ersten Syntheseroute wurde zuerst einer der beiden Alkohole des 1,9-Nonandiols selektiv geschützt und diese Schutzgruppe bis zum Intermediat **5** beibehalten. Erst dann wurde, nach Entschützung, das für die Grignardreaktion notwendige Halogenid hergestellt (Abb. 17). Zwar lieferte dieser Weg einen robusten Zugang zum gewünschten Intermediat **6**, die Nachteile dieses Reaktionsweges zeigten sich allerdings schon im ersten Schritt, bei welchem keine Ausbeuten von über 50 % erhalten werden konnten. Ein weiterer Nachteil liegt in der „umständlichen“ Reaktionsführung, welche als Reaktionsschritte ein Schützen, ein Entschützen und eine Transformation zum gewünschten Halogenid nötig machte. Durch eine geänderte Reaktionsführung, in welcher die Einführung des Halogenids in Form des 9-Bromononal-1-ol<sup>[117]</sup> direkt zu Beginn der Synthese durchgeführt wurde, konnte die Ausbeute im ersten Schritt von 47 % auf 97 % mehr als verdoppelt werden. Da sich das Bromid unter den nachfolgenden Reaktionsbedingungen, so auch bei der zweiten Wittigreaktion, in welcher das Ylid *in situ* mit n-BuLi erzeugt wurde und somit eine erhöhte Chance für eine Nebenreaktion mit dem halogenierten Edukt bestand, als äußerst stabil zeigte (Abb. 18), konnte hier eine wesentliche Verbesserung der Synthese erzielt werden. Neben einer Optimierung der Ausbeute bis zum Fragment **6**, welche von 12.3 % auf nunmehr 58.2 % gesteigert wurde, konnte auch durch den Wegfall des Schützens und Entschützens der primären Alkoholgruppe von **2** eine Reduzierung der erforderlichen Stufenanzahl von neun Stufen auf nunmehr nur noch sieben Stufen erreicht werden.

## Ergebnisse und Diskussionen

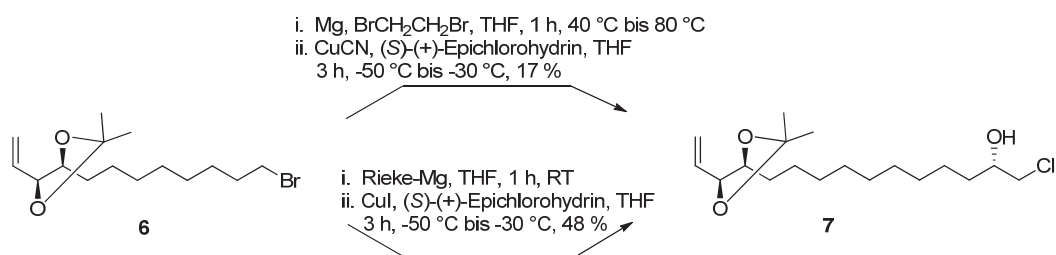


**Abb. 18:** Synthesedetail zur Darstellung der Verbindung **6** ausgehend ihres entsprechenden Aldehyds.

Während die Darstellung des endständigen Alkens bei der ersten, silylgeschützten Reaktionsführung in guten Ausbeuten verlief, bereitete die Ausbildung dieser C=C Doppelbindung in der optimierten, halogenierten Variante erheblich mehr Probleme. So konnten unter den gleichen Reaktionsbedingungen, d.h. die Darstellung des Ylids bei 0 °C, zu welchem anschließend der entsprechende Aldehyd langsam hinzugefügt wurde und das Gemisch über Nacht bei Raumtemperatur gerührt wurde, der Wittigreaktion lediglich eine Ausbeute von 30 % erreicht werden (gegenüber 77 % im ersten, silylgeschützten Fall), was einer Verschlechterung der Ausbeute um knapp 60 % entspricht. Ein Versuch, die Bildung der C=C Doppelbindung statt dem Wittigreagenz mit Hilfe des Tebbe-Reagenzes vorzunehmen, führte zu einer noch geringeren Ausbeute von gerade einmal 19 %. Erst durch eine Optimierung der Durchführung der Wittig-Reaktion konnte die Ausbeute in diesem Schritt schlussendlich auf 88 % erhöht werden. Die nun eingesetzte Methode wurde analog des von Ghosh<sup>[118]</sup> etablierten Verfahrens durchgeführt, wobei das Ylid nun bei einer Temperatur von -20 bis -25 °C hergestellt wurde. Als Besonderheit und in Abweichung zur Arbeit von Ghosh wurde dabei jedoch ein 1:1-Verhältnis des Methyltriphenylphosphoniumbromid zum n-Buthyllithium eingesetzt, um ein komplettes Abreagieren des Buthyllithium-Reagenzes mit dem Methyltriphenylphosphoniumbromid zu gewährleisten; anschließend wurde diese Reaktionslösung langsam zu einer ebenfalls auf -20 bis -25 °C gekühlten Lösung des Aldehyds in THF gegeben, um hier eine ebenfalls mögliche Nebenreaktion mit dem Halogenid zu vermeiden. Nach der Zugabe wurde das Reaktionsgemisch unter Erwärmen auf Raumtemperatur für weitere 2 Stunden Reaktionszeit gerührt und anschließend aufgearbeitet.

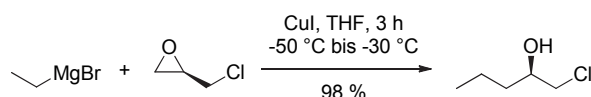
Ein weiterer Schritt zur Optimierung der Syntheseroute lag in der Verbesserung der Darstellung des Grignard-Reagenzes (Abb. 19).

## Ergebnisse und Diskussionen



**Abb. 19:** Synthesedetail zur Darstellung der Verbindung **7** ausgehend von **6** in einer Grignard-Reaktion.

Die Bildung der entsprechenden Mg-Organometallverbindung aus dem Intermediat **6** wurde im ersten, silylgeschützten Ansatz mittels der klassischen Grignard-Methode, in welcher blanke Magnesiumspäne vorgelegt und durch einige Tropfen 1,2-Dibromoethan voraktiviert werden, bevor das umzusetzende Halogenid **6** unter leichtem Erhitzen langsam hinzugeführt wurde, durchgeführt. Im zweiten Ansatz lieferte diese Methode jedoch schlechte bis teilweise keine Ausbeuten nach der Umsetzung mit dem Epoxid zum entsprechenden Alkohol **7**. In einer Testreaktion wurde anschließend überprüft, ob die geringen Ausbeuten mit der Bildung der Organometallverbindung, also dem ersten Schritt in der Grignard-Reaktion, oder aber mit der Reaktion des Epoxids und somit dem zweiten Schritt zusammenhängt. Dazu wurde die kommerziell erhältliche Organometallverbindung Ethylmagnesiumbromid mit (S)-(+)-Epichlorohydrin und katalytischen Mengen Cu(I)I unter den in Abb. 20 angegebenen Reaktionsbedingungen umgesetzt.

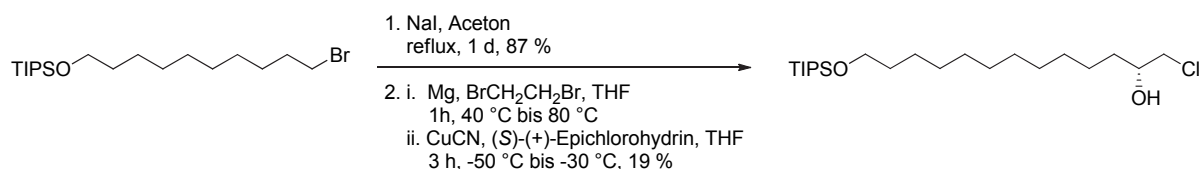


**Abb. 20:** Testreaktion von Ethylmagnesiumbromid mit (S)-(+)-Epichlorohydrin unter den angegebenen Reaktionsbedingungen.

Da bei dieser Reaktion ein Umsatz von 98 % erzielt werden konnte, ist davon auszugehen, dass die Probleme bei diesem Schritt nicht auf die Reaktion der Organometallverbindung mit dem Epoxid, sondern auf die Bildung der Organometallverbindung zurückzuführen sind. In einer zweiten Testreaktion wurde daher getestet, ob sich die Bildung des Grignardreagenzes durch eine Erhöhung der Nucleophilie des Halogenids verbessern lässt. Hierzu wurde zuerst das Bromid gegen ein Iodid ausgetauscht, um die dann nucleophilere Ausgangssubstanz in eine Organometallverbindung zu überführen (Abb. 21).



## Ergebnisse und Diskussionen



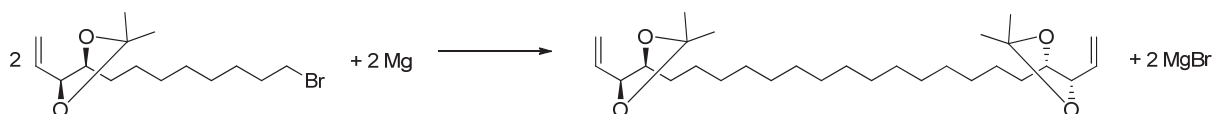
**Abb. 21:** Testreaktion zur Darstellung der Organometallverbindung mit einer iodierten Verbindung.

Auch hier zeigte sich, dass sich zwar Produkt bildete, dieses allerdings auch nur in geringen Ausbeuten von 19 %. Eine Adaptierung dieser Variante auf die Synthese von **7**, d.h. eine Überführung von **6** in ein entsprechendes Iodid-Derivat und anschließende Grignardreagenzbildung, führte zu keiner nennenswerten Verbesserung der Ausbeute nach der Reaktion mit dem Epoxid.

Als letzter Lösungsansatz für eine Optimierung der Grignard-Reaktion wurde dann die Verwendung von Rieke-Magnesium evaluiert. Rieke-Metalle wie z. B. das Rieke-Magnesium sind hochreaktive Metallpulver, welche ursprünglich durch Reuben D. Rieke entwickelt wurden <sup>[119]</sup>. Der Vorteil von Rieke-Metallen besteht in ihren großen Reaktionsoberflächen und das Fehlen von deaktivierenden Oberflächenoxiden, welche eine Reaktion verlangsamen würden. Während normale Organomagnesiumverbindungen aufgrund der Reaktionsträgheit der eingesetzten Magnesiumspäne bei höheren Temperaturen hergestellt werden müssen, lassen sich Arylhalide selbst bei -78 °C noch mit Rieke-Magnesium zum entsprechenden Organometall umsetzen, so dass hier sogar "unmögliche" Grignard-Verbindungen gebildet werden können <sup>[120]</sup>. In der Tat gelang es durch den Einsatz von Rieke-Magnesium, die Ausbeute in diesem Schritt auf 48 % (und somit um einen Faktor 3) zu steigern. Hierzu wurden 3 eq einer kommerziell-erhältlichen Rieke-Magnesium-Suspension (2.5 g in 100 mL THF) bei Raumtemperatur vorgelegt und das Alkylhalid (0.8 M in THF) langsam hinzu getropft. Nach der Zugabe wurde noch eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt und die Reaktionslösung anschließend für die Zugabe des Epoxids auf -50 °C abgekühlt (Abb. 19). Ein Problem bei dieser Methode besteht nun allerdings darin, dass aufgrund der hohen Reaktivität der Magnesiumspezies eine konkurrierende Kupplungsreaktion des Typs "Wurtz-Fittig-Reaktion" auftreten kann. Bei dieser Nebenreaktion reagieren bereits gebildete Organomagnesiumorganyle mit noch nicht umgesetzten Alkylhalogeniden unter Abspaltung von Magnesiumbromid zu kovalenten C-C Bindungen (Abb. 22). Aufgrund der deutlichen Ausbeutenoptimierung im Vergleich zur Darstellung der

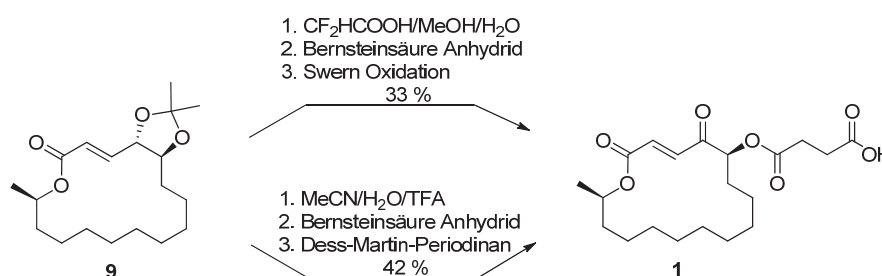
## Ergebnisse und Diskussionen

Organomagnesiumverbindung mit Magnesiumspänen wurde diese Art der konkurrierenden Nebenreaktion bei der Synthese aber in Kauf genommen.



**Abb. 22:** Schematische Darstellung der Wurtz-Fittig-Reaktion.

Zuletzt wurden die nach dem Ringschluss durchgeführten Reaktionsschritte noch optimiert (Abb 23):



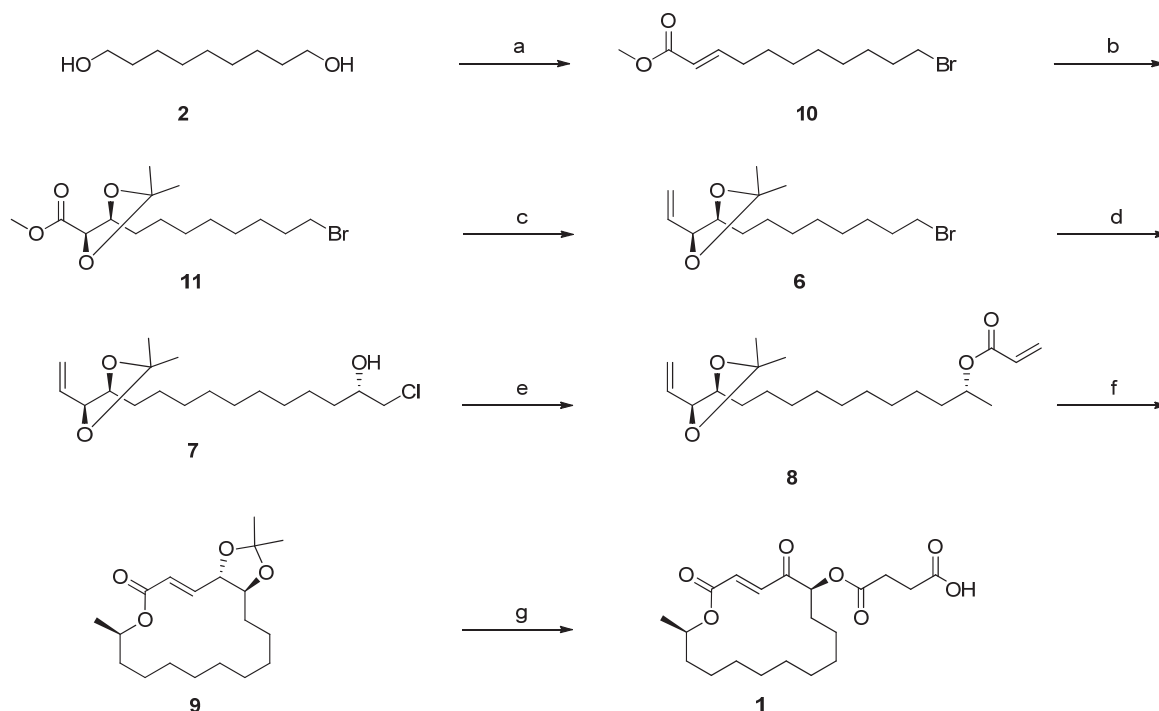
**Abb. 23:** Verschiedene Darstellung von **1** ausgehend von **9**.

Ein Literatur-bekannter und in der ersten Synthese analog-durchgeführter Weg besteht in einer Entschützung des Ketals mit Difluoroessigsäure, gefolgt von einer Veresterung der Hydroxylgruppe der (C5) Position mittels Bernsteinsäure-Anhydrid und einer abschließenden Swern-Oxidation des freien Alkohols an der (C4)-Position<sup>[116]</sup>. In der ersten Synthese konnten diese Schritte in einer Gesamtausbeute von 33 % erfolgreich nachsynthetisiert werden. Durch Optimierungen der Reaktionsbedingungen konnten jedoch anschließend bessere Ausbeuten erzielt werden. Durch die Verwendung von TFA in einem Acetonitril/Wasser (2:1)-Gemisch<sup>[107]</sup> anstelle der Difluoroessigsäure konnte die Ausbeute bei der Entschützung der Ketalgruppe von 86 % auf 92 % erhöht werden. Die Veresterung mit Bernsteinsäureanhydrid wurde beibehalten<sup>[116]</sup>, anstelle der Swern-Oxidation, in welcher ursprünglich eine Ausbeute von 52 % erreicht wurde, wurde diesmal jedoch eine Dess-Martin-Periodinan-Oxidation durchgeführt. Neben der deutlich geringeren Reaktionszeit von zwei Stunden im Vergleich zu 20 Stunden bei der Swern-Oxidation, konnte so auch eine Verbesserung der Ausbeute auf 81 % erreicht werden. Um durch eine basische Aufarbeitung der Reaktionslösung keine Spaltung des Esters zu provozieren, wurde dabei auch die Reaktionsaufarbeitung verändert;

## Ergebnisse und Diskussionen

so wurde die Reaktionsmischung zur Trockne eingedampft und der Rückstand anschließend ohne weitere Aufarbeitung säulenchromatographisch über Silica gereinigt.

Die Gesamtausbeute der Totalsynthese von (-)-A26771B (**1**) konnte somit durch die einzelnen Optimierungsschritte von 0.51% auf 8.6 % gesteigert werden. Gleichzeitig wurde die Anzahl der Reaktionsschritte um zwei auf nunmehr nur noch 14 Stufen reduziert (Abb. 24).



**Abb. 24:** optimierte Syntheseroute zu (-)-A26771B (**1**). Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) i. HBr, Toluol, 3 d, 130 °C; ii. PCC, DCM, 4 h, RT; iii.  $\text{Ph}_3\text{PCCOOMe}$ , DCM, 12 h, RT (91 %); (b) i. AD-Mix  $\alpha$ ,  $t\text{BuOH}/\text{H}_2\text{O}$  (1:1), 24 h, 0 °C; ii. Dimethoxypropan, Aceton,  $p\text{TsOH}$ , 60 °C, 1 h (90 %); (c) i. DIBAL-H, Toluol, 3 h, -78 °C; ii.  $n\text{-BuLi}$ ,  $\text{Ph}_3\text{PMeBr}$ , 12 h, -20 °C bis RT (70 %); (d) i. Rieke-Mg, THF, 1 h, RT; ii. (S)-(+)-Epichlorhydrin,  $\text{Cu(I)I}$ , THF, 3 h, -50 °C bis -30 °C (48 %); (e) i.  $\text{LiAlH}_4$ , THF, 12 h, RT; ii. Acryloylchlorid, DCM, DIPEA, 4 h, 0 °C (88 %); (f) Grubbs 2<sup>nd</sup> Generation-Katalysator, DCM, 50 °C, 20 h (84 %); (g) i. TFA,  $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$  (2:1), 1 h, RT; ii. Bernsteinsäureanhydrid, DIPEA, DCM, 2 h, 50 °C; iii. Dess-Martin-Periodinan, DCM, 2 h, RT (42 %).

Die so optimierte Syntheseroute besteht somit aus einer Monohalogenierung mittels Bromwasserstoffsäure von 1,9-Nonandiol (**2**) zu 9-Bromononal-1-ol (**84**), welches im nächsten Schritt durch eine Oxidation mit Pyridiniumchlorochromat zum entsprechenden Aldehyd **85** oxidiert wurde. Dieser wurde genutzt, um mit (Methoxycarbonylmethylen)-triphenylphosphoran in einer Wittig-Reaktion den

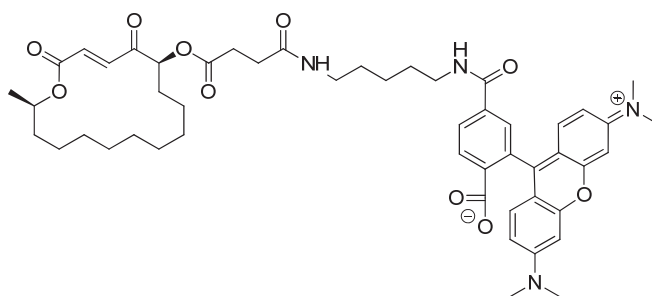
## Ergebnisse und Diskussionen

---

entsprechenden Methylester **10** zu generieren. An der so ausgebildeten Doppelbindung wurden anschließend in einer Sharpless-Dihydroxylierung mit dem AD-Mix  $\alpha$  (*asymmetric dihydroxylation mix*) enantioselektiv durch einen Unterseitenangriff des (DHQ)<sub>2</sub>PHAL die beiden sekundären Alkohole in einer (2*R*, 3*S*)-Konfiguration mit einem *ee* (*enantiomeric excess*) von 85 % erzeugt. Die Bestimmung des Enantiomerenüberschusses erfolgte analog der Darstellung von Hoyer et. al. <sup>[121]</sup>, in welcher das synthetisierte Diol **86** mit (*R*)-(-)- $\alpha$ -Methoxy- $\alpha$ -(trifluoromethyl)phenylacetylchlorid zum entsprechenden Mosher-Ester umgesetzt wurde und das Verhältnis anschließend durch NMR-Bestimmung wie folgt ermittelt wurde:  $ee = \frac{R-S}{R+S} \%$ . Im nächsten Schritt wurde das synthetisierte 1,2-Diol **86** mit 2,2-Dimethoxypropan und katalytischen Mengen *p*TsOH in Aceton als Ketal **11** geschützt. Eine Reduktion des Methylesters mit DIBAL-H zum Aldehyd **87**, welcher im Verhältnis von 8:1 zum parallel entstehenden primären Alkohol isoliert werden konnte, sowie eine darauf folgende Wittig Reaktion mit Methyltriphenylphosphoniumbromid und *n*-Buthyllithium zum entsprechenden Alken lieferte die Vorstufe **6** für die anschließende Grignard-Reaktion. Die Bildung des Grignard-Reagenzes erfolgte durch den Einsatz des hochreaktiven Rieke-Magnesiums, welches anschließend mit (*S*)-(+)-Epichlorohydrin umgesetzt wurde, so dass die Stereochemie der Methylgruppe an der späteren (C15)-Position des Naturstoffes durch Einsatz dieses enantiomerenreinen Reagenzes festgelegt wurde. Zur Darstellung des Naturstoffes wurde darauf eine selektive Dehalogenierung des Chlorids mit Lithium-Aluminium-Hydrid zur Verbindung **88** durchgeführt. Die Reaktion mit Acrylsäurechlorid führte schließlich zur gewünschten linearen Vorstufe **8**, welches durch eine ringschließende Metathese zum entsprechenden 16-gliedrigen Makrolid **9** umgesetzt wurde. Diese wurde im Anschluss mittels eines Grubbs 2<sup>nd</sup> Generation-Katalysators durchgeführt. Zum Schluss wurde mit verdünnter Trifluoroessigsäure die Ketalschutzgruppe abgespalten, wodurch das Diol **89** erhalten wurde. Durch eine Umsetzung mit Bernsteinsäureanhydrid wurde in hoher Regioselektivität der Succinimidester an der Alkoholfunktion der (C5)-Position gebildet (in einem Verhältnis von 2.7:1 im Vergleich zu einer Veresterung an der (C4) Position) <sup>[116]</sup>. Die nachfolgende Oxidation des noch freien Alkohols (C4) mittels Dess-Martin-Periodinan führte dann zum Naturstoff (-)-A26771B (**1**).

## Ergebnisse und Diskussionen

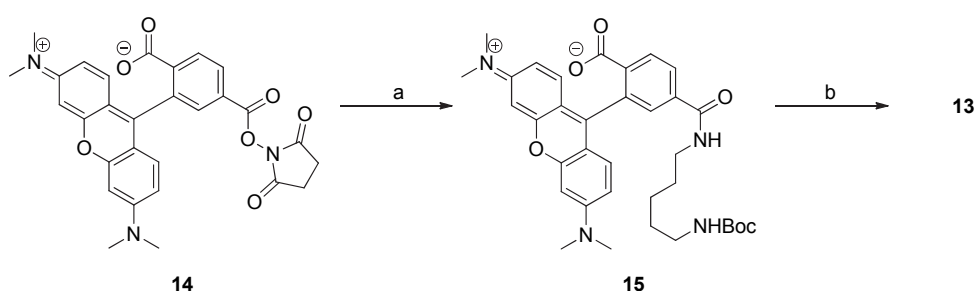
Zur Testung der Bioreaktivität des Naturstoffes (-)-A26771B (**1**) mittels einem aktivitätsbasierten Protein-Profilings (*activity-based-protein-profiling*, ABPP)-Ansatzes wurde der Naturstoff in einem nächsten Schritt mit einer fluoreszenten Rhodamin-Einheit versehen. Diese wurde über einen Linker an die freie Säuregruppe des Naturstoffes angebracht, so dass eine (-)-A26771B-basierte aktivitätsbasierte Sonde (*activity based probe*, ABP) (**13**) erhalten werden konnte (Abb. 25).



13

**Abb. 25:** Struktur des mit Rhodamin-markierten (-)-A26771B-Derivates (**13**).

Für die Synthese des Rhodamin-markierten Naturstoffes **13** wurde dementsprechend 5-(und 6)-Carboxytetramethylrhodamine Succinimidylester (**14**) mit N-Boc-1,5-Diaminopentan zu **15** umgesetzt. Eine saure Abspaltung der Boc-Schutzgruppe und anschließende Peptidkupplung an die Säurefunktion der Seitenkette des Naturstoffes unter Verwendung der Kupplungsreagenzien HOBt und EDC·HCl führte dann zur gewünschten Sonde **13** (Abb. 26).

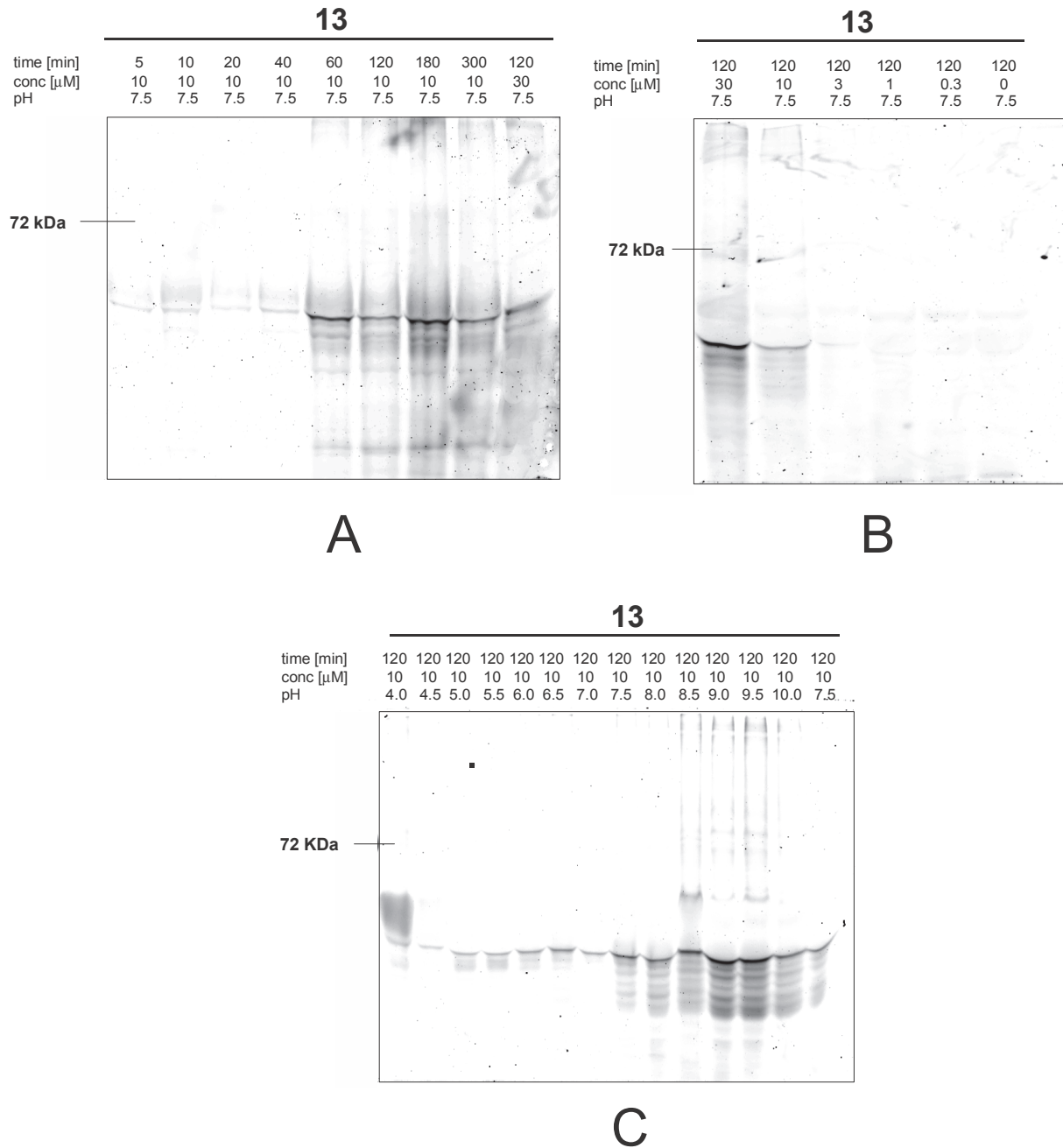


**Abb. 26:** Synthese des Rhodamin-markierten Naturstoffderivates **13**. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) N-Boc-1,5-diaminopentan, TEA, DMF, 2 h, RT (60 %); (b) i. HCl, Dioxan, 5 h, RT; ii. **1**, HOBt, EDC·HCl, TEA, DCM, 24 h, RT (26 % nach HPLC).

Anschließend wurden mit dieser Sonde Pulldown-Experimente an Blätterextraktlysaten von *Arabidopsis thaliana* durchgeführt (Abb. 27). Leider konnten mit diesem Ansatz außer dem hoch-abundanten (und daher vermutlich unspezifisch-markierten) Enzym RuBisCo (Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase),

## Ergebnisse und Diskussionen

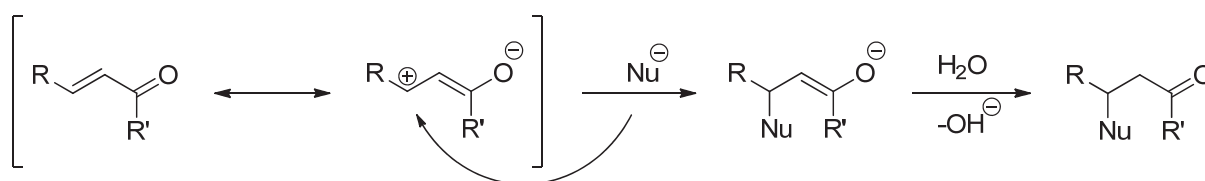
und auch dieses nur bei hohen Konzentrationen  $\geq 10 \mu\text{M}$ , keine weiteren Zielmoleküle aufgefunden werden.



**Abb. 27:** ABPP-Ansatz mit der Rhodamin-markierten Sonde **13**: Gelanalyse der Markierung **(A)** nach einer zeitabhängigen *in vitro* Inkubation eines *Arabidopsis thaliana*-Blätterextraktes bei pH 7.5 und 10  $\mu\text{M}$  Substrat; **(B)** nach einer konzentrationsabhängigen *in vitro* Inkubation von 2 Stunden eines *Arabidopsis thaliana*-Blätterextraktes bei pH 7.5; **(C)** nach einer pH-abhängigen *in vitro* Inkubation von 2 Stunden eines *Arabidopsis thaliana*-Blätterextraktes mit 10  $\mu\text{M}$  Substrat.

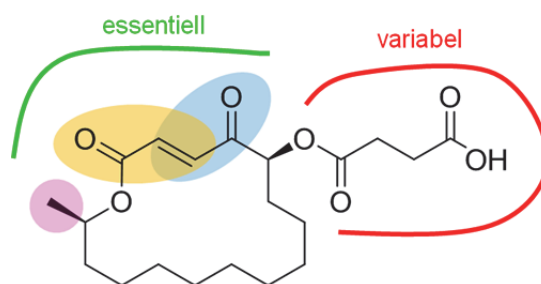
## Ergebnisse und Diskussionen

Dieses Ergebnis war erstaunlich, da  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Carbonylverbindungen als klassische Michael-System in der Regel sehr reaktive, funktionelle Gruppen darstellen, welche an der  $\beta$ -Position Nucleophile unter Ausbildung einer irreversiblen Bindung addieren können (Abb. 28). Ein Grund für die fehlgeschlagene Targetidentifizierung könnte sein, dass die Esterbindung des Antibiotikums (-)-A26771B unter den gewählten Bedingungen einer enzymatischen Spaltung, z.B. durch Esterasen oder Lipasen, unterliegt, und eine Targetidentifizierung somit äußerst schwierig ist.



**Abb. 28:** Reaktion eines Nucleophils (Nu) an ein Michael-System.

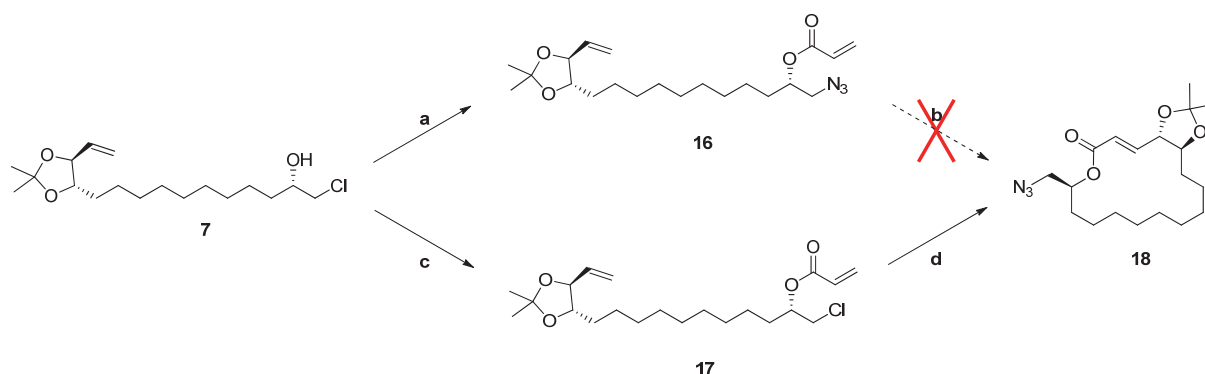
Deshalb wurde zu diesem Zeitpunkt ein neuer Ansatz für eine aktivitätsbasierte Sonde, in welcher die Reportereinheit nicht mehr an der Seitenkette angebracht wurde, verfolgt. Hierzu sollte eine Azid-Modifikation zur Schaffung einer „Klick-Sonde“, an welche nach einer *in vivo*-Markierung später die trifunktionale Reportereinheit aus Rhodamin und Biotin gebunden werden kann, in den Naturstoff eingebracht werden. Als mögliche Position für diese Azidgruppe wurde die Methylgruppe an der (C5)-Position des Rings und in Nachbarschaft zum reaktiven Zentrum ausgewählt. Diese Position erscheint günstig, da an dieser Stelle aufgrund des Reaktionsweges eine Azidgruppe relativ leicht eingebracht werden kann und diese geringe Modifikation vermutlich nur einen geringen Einfluss auf die Bioaktivität des Moleküls besitzt. Auch eine eventuell auftretende enzymatische Abspaltung der Seitenkette hätte dann keinen Effekt mehr auf die Markierungseffizienz des Naturstoffes <sup>[114]</sup> (Abb. 29).



(-)-A26771B

**Abb. 29:** Eine Analyse der für die Bioaktivität maßgeblichen funktionellen Einheiten des Naturstoffes (-)-A26771B (**1**) bietet eine Modifikation der Methylgruppe (rosa markiert) durch ein Azid an.

Leider erwies sich jedoch die Einführung der Azidgruppe als schwieriger als ursprünglich gedacht. In einem ersten Versuch sollte das Azid an der (C15) Position durch eine nucleophile Substitution des Chlorids **7** erfolgen (Abb. 30). Dieser Syntheseweg stellte sich aber trotz seiner guten Ausbeuten von > 85 % für diesen Schritt als nicht geeignet heraus, da im nachfolgenden Schlüsselschritt, der ringschließenden Metathese, die Ringschlussreaktion fehlschlug. Da ein Versuch des Ringschlusses eines Intermediates **17**, welches über ein Chlorid an der (C15)-Position verfügte, jedoch erfolgreich zum chlorierten Makrolid durchgeführt werden konnte, konnte die Einführung des Azid-Reporters durch eine nucleophile Substitution des Chlorids nach dem Ringschluss erreicht werden. Da bei dieser Reaktion jedoch Nebenreaktionen mit dem bereits ausgebildeten Michael-System auftraten, konnte diese Reaktionsfolge nur in moderaten Ausbeuten realisiert werden.



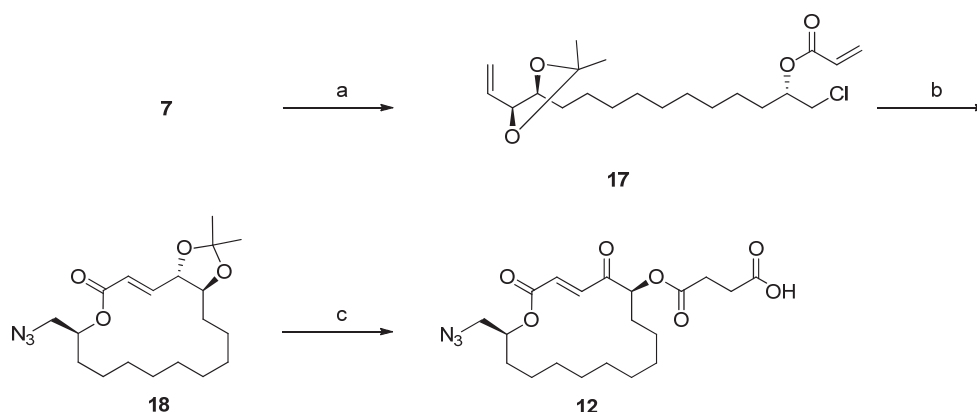
**Abb. 30:** Synthesedetail zur Synthese des Azid-modifizierten Makrolids **18**. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) i.  $\text{NaN}_3$ , DMF, 48 h, 100 °C; ii. Acryloylchlorid, DCM, DIPEA, 4 h, 0 °C (48 %); (b) Grubbs 2<sup>nd</sup> Generation-Katalysator, DCM, 50 °C, 20 h; (c) Acryloylchlorid, DCM, DIPEA, 4 h, 0 °C (88 %); (d) i. Grubbs 2<sup>nd</sup> Generation-Katalysator, DCM, 50 °C, 20 h; ii.  $\text{NaN}_3$ , DMF, 48 h, 100 °C (25 %).



## Ergebnisse und Diskussionen

Interessanterweise führte auch ein Halogen-Halogen-Austausch, bei welchem das Chlorid mit Natriumiodid in eine in nucleophilen Substitutionen häufig deutlich aktiveres Iodid ausgetauscht wurde, insgesamt zu keinen höheren Ausbeuten.

Die weiteren Schritte zur Darstellung des Azid-modifizierten Naturstoffes wurden dann analog zu der bereits etablierten Syntheseroute durchgeführt. So wurde nach dem Halogen-Azid-Austausch die Ketalschutzgruppe an der (C4) und (C5)-Position unter sauren Bedingungen mit TFA entfernt. Mittels Bernsteinsäureanhydrid wurde dann die benötigte Veresterung der freien Alkoholfunktion an (C5) durchgeführt und schlussendlich die Alkoholfunktion an der (C4)-Position mit Dess-Martin-Periodinan oxidiert (Abb. 31). Da im letzten Schritt nach der Oxidation mit Dess-Martin-Periodinan unerwarteterweise nur sehr geringe Ausbeuten erreicht werden konnten, konnte das synthetisierte N<sub>3</sub>-(-)-A26771B Derivat **12** nur mittels <sup>1</sup>H-NMR und LC-MS (negativer Modus) analysiert werden. Nichtsdestotrotz bestätigten diese Experimente eindeutig die erfolgreiche Synthese des Derivates **12**.

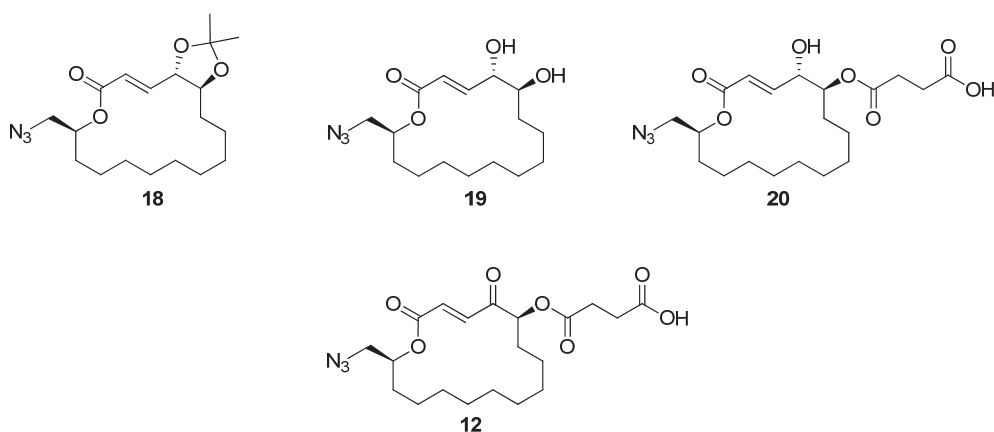


**Abb. 31:** Syntheseroute zu N<sub>3</sub>-(-)-A26771B (**12**). Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) Acryloylchlorid, DCM, DIPEA, 4 h, 0 °C (>98 %); (b) i. Grubbs 2<sup>nd</sup> Generation-Katalysator, DCM, 50 °C, 20 h; ii. NaN<sub>3</sub>, DMF, 48 h, 100 °C (23 %); (c) i. TFA, MeCN/H<sub>2</sub>O (2:1), 1 h, RT; ii. Bernsteinsäureanhydrid, DIPEA, DCM, 2 h, 50 °C; iii. Dess-Martin-Periodinan, DCM, 2 h, RT (18 %).

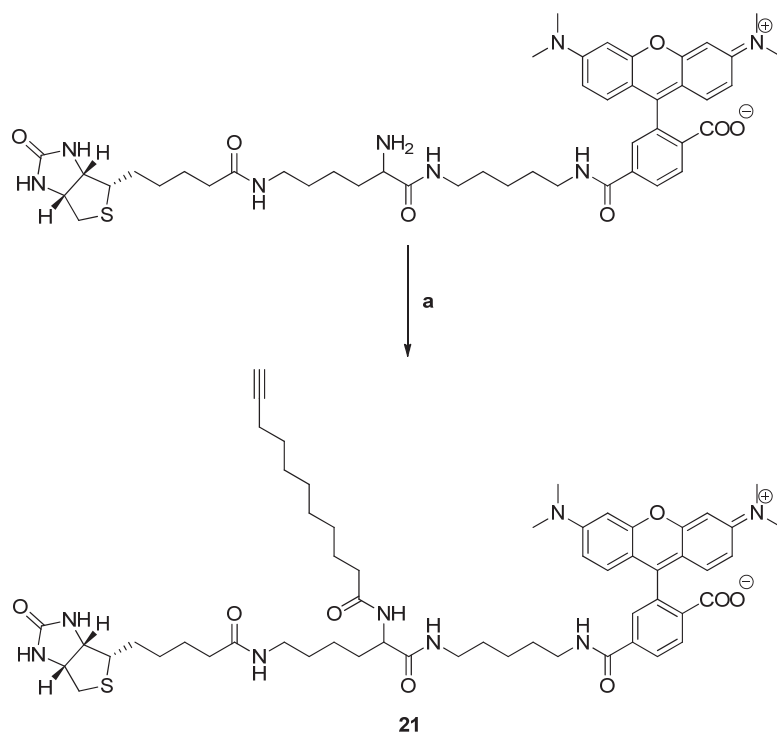
Die folgenden biologischen ABPP-Studien mit dem Azid-versehenen Makrolid **12** und den Vorstufen **18** - **20** (Abb. 32) wurden von Dr. Farnusch Kaschani sowohl am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln, in der *Plant-Chemetics* Gruppe von Dr. Renier van der Hoorn als auch an der Universität Duisburg-Essen in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Markus Kaiser durchgeführt. Hierzu wurde im Vorfeld die trifunktionale Reportereinheit **21** synthetisiert, welche neben der für die "Klick-Chemie" essentielle Alkin-Einheit auch eine fluoreszente Rhodamingruppe zur Geldetektion sowie ein angehängtes Biotin-Molekül für eine spätere

## Ergebnisse und Diskussionen

Affinitätsreinigung enthielt (Abb. 33). Die Azid-versehenen Moleküle **12** und **18** - **20** wurden dabei verschiedenen *in vivo*- sowie *in vitro*-Experimenten unterzogen und anschließend *in vitro* an die Reportereinheit **21** "geklickt".



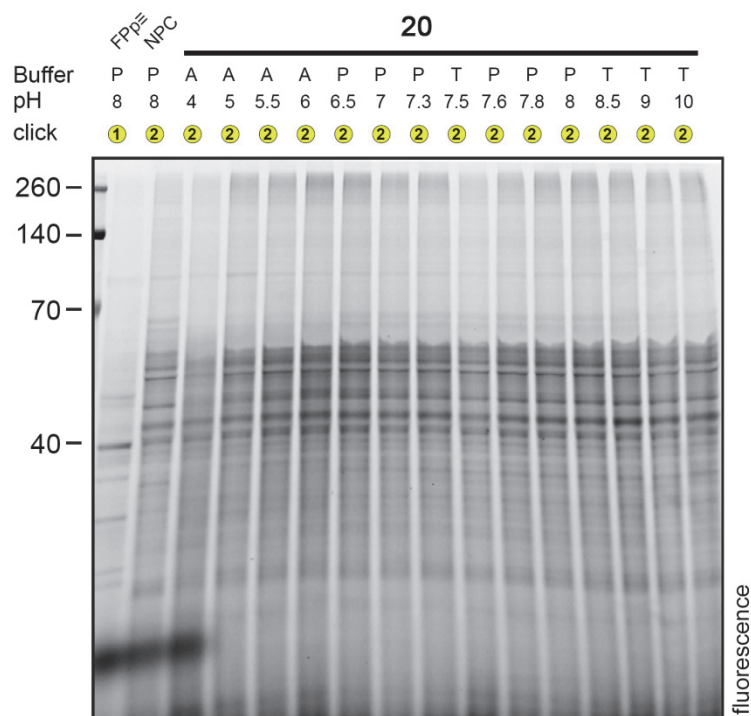
**Abb. 32:** getestete Azid-Derivate basierend auf Makrolid **1**.



**Abb. 33:** Synthese der Reportereinheit **21**. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) 10-Undecinsäure, HATU, DMAP, DIPEA, DMF, 12 h, RT (72 %).

## Ergebnisse und Diskussionen

In einem ersten Experiment wurde eine pH-abhängige *in vitro*-Inkubation von **18 - 20** über 3 Stunden bei Raumtemperatur mit einem *Arabidopsis thaliana*-Zellkulturextrakt durchgeführt. Anschließend wurden die Proben mit 4 eq der trifunktionalen Probe **21**, 400 eq TCEP, 20 eq TBTA sowie 200 eq CuSO<sub>4</sub> versetzt, die Reaktionsmischung für 2 Stunden geschüttelt (d.h. über 2 Stunden "geklickt") und dann über ein SDS-Gel aufgetrennt. In einem zweiten Experiment wurden die Sonden **12** und **18 - 20** *in vivo* in *E. coli* getestet. Dazu wurden die *E. coli* Zellen bei OD<sup>600</sup> = 0.5 (1.5 mL) bei einer Konzentration von 100 µM für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugieren gesammelt, mit PBS-Puffer gewaschen und in 100 µL PBS lysiert. Für die anschließende "Klick-Reaktion" wurden 10 µM **21**, 2 mM TCEP, 100 µM TBTA und 1 mM CuSO<sub>4</sub> verwendet. Exemplarisch für diese Experimente sei der Fluoreszenzscan der getesteten Sonde **20** gezeigt (Abb. 34).



### labelling:

1 mM TCEP, 10 mM Buffer, 5 µM Probe or 10 µM FPp≡

### click reaction:

Buffer adjust to 30 mM phosphate pH 8.0 then add

① 20 µM RhN<sub>3</sub>, 2 mM TCEP, 100 µM TBTA, 1 mM CuSO<sub>4</sub>

② 20 µM Tri≡, 2 mM TCEP, 100 µM TBTA, 1 mM CuSO<sub>4</sub>

**Abb. 34:** pH-abhängige *in vitro*-Inkubation von **20** in *Arabidopsis thaliana*-Zellkulturextrakt (Experiment durch Kaschani 2012).

## Ergebnisse und Diskussionen

---

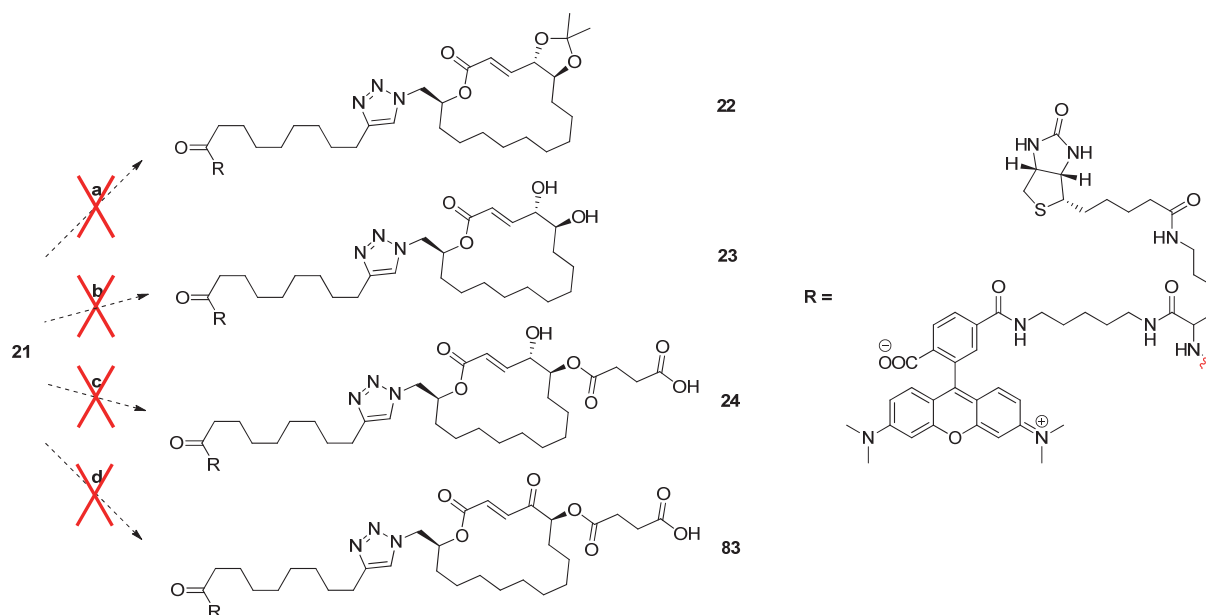
Bei der Auswertung der Fluoreszenzscans der *in vivo*- und *in vitro*-Experimente fiel auf, dass die negative Kontrolle NPC (*no probe control*) ein ähnliches Markierungsmuster wie die Makrolidderivate **12** und **18–20** aufwies. Da dieses in allen durchgeführten Experimenten der Fall war, deutet dieser Befund daraufhin, dass nur unspezifische Markierungen bei diesen Experimenten auftraten. Dieses erklärt dann auch den jeweils gleichbleibenden Hintergrund bei den Sonden und der Negativkontrolle. Da die Positivkontrolle (FPp $\equiv$ ) nicht denselben Hintergrund wie die restlichen Proben aufweist sondern nur die für diese Probe charakteristischen Banden zu beobachten sind, zeigt sich, dass hier sowohl die Inkubation als auch der spätere "Klick" einwandfrei funktioniert haben. Ein Grund für diesen negativen Befund könnte der sterische Anspruch des Azid-Linkers sein, welcher in einem relativ-geringen Abstand von nur einem C-Atom an den Ring gebunden ist. In der auch sterisch anspruchsvollen Klick-Reaktion könnte dies somit zu Problemen führen und die Ausbildung des Triazol-Produktes somit verhindert werden.

Als weitere Experimente wurden mit den Naturstoffderivaten **12** und **18 - 20** noch eine *in vivo*-Inkubation in *Arabidopsis thaliana* durchgeführt, an welche anschließend *in vitro* eine BODIPY-Alkin-Reportereinheit geklickt wurde, sowie eine *in vivo* Inkubation von verschiedenen *Staphylococcus*-Spezies, gefolgt von einem *in vitro* Klick an die Reportereinheit **21**. Auch bei diesen Experimenten konnten leider keine spezifischen Banden in den anschließenden Geldetektionsexperimenten aufgefunden werden. Die folgenden Bakterienstämme wurden dabei getestet:

- *Staphylococcus aureus*
- *Staphylococcus pneumoniae*
- *Staphylococcus epidermidis*
- *Staphylococcus aureus* MRSA
- *Staphylococcus pyogenes*
- *Enterococcus faecium*
- *Stenotrophomonas maltophilia*
- *Pseudomonas aeruginosa* (345 mucoid)

Deshalb wurde ein neuer Ansatz verfolgt, um die Aktivität der Makroliden in ABPP-Experimenten zu testen. Hierzu sollte die Reportereinheit **21** bereits vor der Inkubation auf die Moleküle **18 - 20** geklickt werden und dementsprechend die trifunktionalen, aktivitätsbasierten Sonden **22 - 24** synthetisiert werden (Abb. 35).

## Ergebnisse und Diskussionen



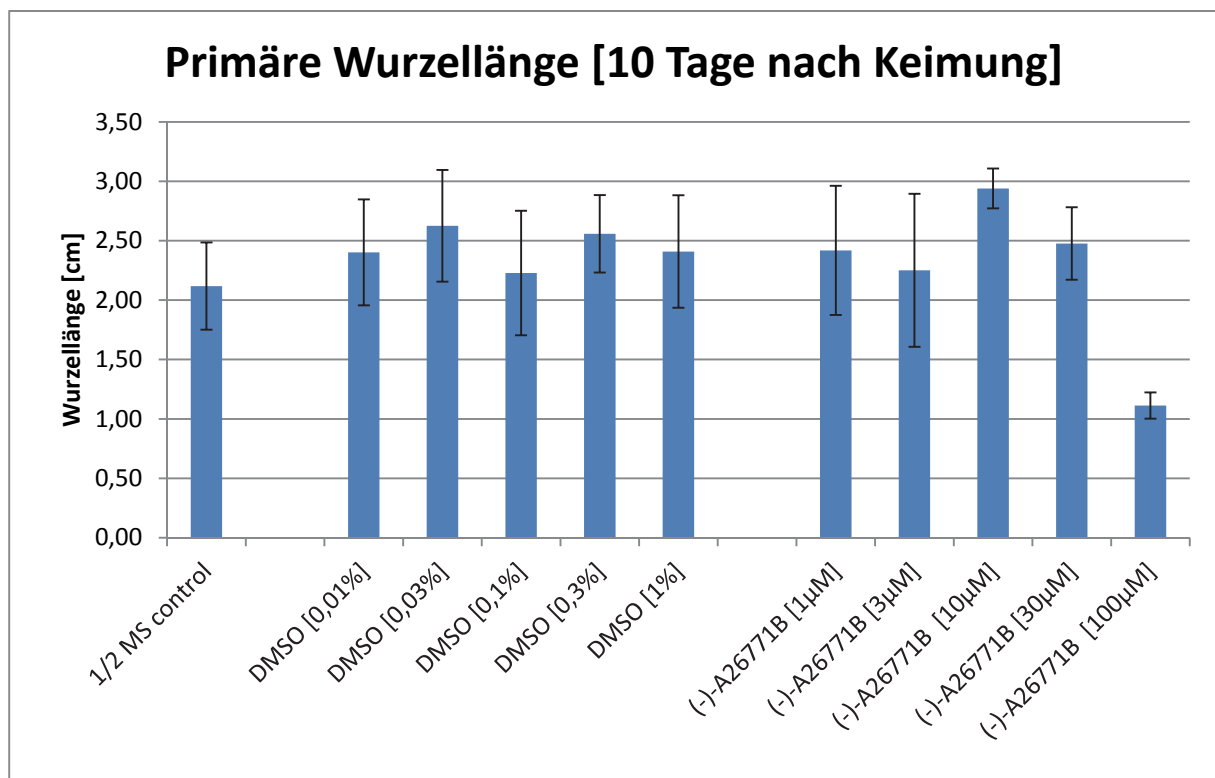
**Abb. 35:** Versuchte Synthese der trifunktionalen Sonden **22**, **23**, **24** und **83**. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) **18**, TBTA, TCEP, CuSO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O, 7 d, 75 °C; (b) **19**, TBTA, TCEP, CuSO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O, 7 d, 75 °C; (c) **20**, TBTA, TCEP, CuSO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O, 7 d, 75 °C; (d) **12**, TBTA, TCEP, CuSO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O, 7 d, 75 °C.

Auch bei diesen Experimenten ließ sich keine "Klick-Reaktion" der Azid-modifizierten Makrolide **12**, **18**, **19** und **20** mit der Reportereinheit **21** durchführen. Diese Experimente bestätigen somit die Vermutung, dass die räumliche Nähe des Azids zum Makrozyklus die Klick-Reaktion verhindert. Da sogar nach über einer Woche unter harschen Reaktionsbedingungen (hohe Reaktionstemperatur im Labormaßstab vs. Raumtemperatur im biologischen Experiment) keine Triazolbildung nachgewiesen werden konnte, kann hiermit auch die Nichtaktivität der Azid-versehenen Sonden in den vorher durchgeführten biologischen Experimenten erklärt werden (bei welcher eine 3-stündige Reaktionszeit und wesentlich mildere Reaktionsbedingungen eingesetzt werden). Gelöst werden könnte dieses Problem der sterischen Hinderung durch den Einsatz eines längeren Linkers zwischen der (C15)-Position des Rings und dem Azid. Ein solches Derivat zeigt jedoch schon größere strukturelle Unterschiede, so dass sich unter Umständen die Bioaktivität des Derivates entscheidend ändert. Aufgrund der Zeitbeschränkung im Rahmen der Dissertation konnten jedoch keine weiteren Synthesen in dieser Richtung durchgeführt werden.

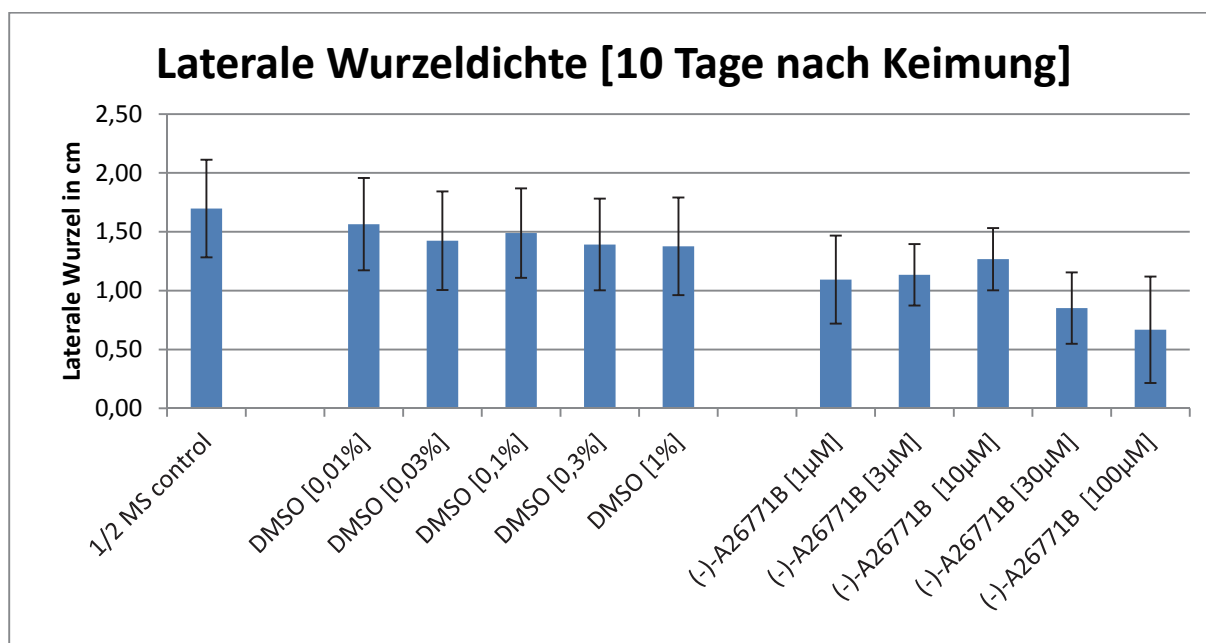
Eine weitere biologische Studie zum Einfluss von (-)-A26771B (**1**) auf das Wurzelwachstum von *Arabidopsis thaliana* (Ökotyp Columbia-0) wurde am Max-

## Ergebnisse und Diskussionen

Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln, durch Markus Schlicht in der Gruppe von Dr. Erich Kombrink durchgeführt. Hierbei wurden in einem ersten Experiment die Pflanzen vor der Keimung mit dem Makrolid **1** versetzt und die Pflanzen 10 Tage nach der Keimung vermessen. Da das Wurzelwachstum in *Arabidopsis thaliana* ein recht empfindliches System darstellt, eignet es sich gut als *read-out* für biologische Substanzen. Generell unterscheidet man zwischen zwei Wachstumseffekten: dem Wachstum der Primärwurzeln und der Zunahme der Dichte der Lateralwurzeln. Das Wurzelwachstum entsteht zum einen durch die mitotische Aktivität der Wurzelmeristeme und zum anderen durch die Zellstreckung der Wurzelzellen, was zu einem sehr schnellen Wachstum führt (Abb. 36 und 37).



**Abb. 36:** Primäre Wurzellänge nach 10-tägiger Keimung bei vorheriger Infizierung der Pflanzen mit dem Naturstoff (-)-A26771B (**1**) bei verschiedenen Konzentrationen (Experiment durch Schlicht 2012).



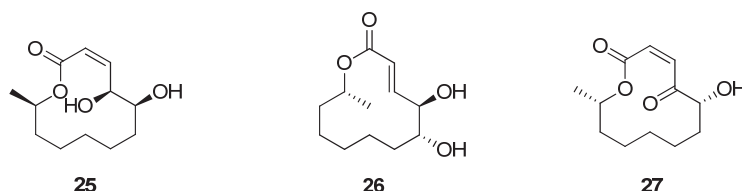
**Abb. 37:** Laterale Wurzeldichte nach 10-tägiger Keimung bei vorheriger Infizierung der Pflanzen mit (-)-A26771B (**1**) bei verschiedenen Konzentrationen (Experiment durch Schlicht 2012).

Die Ergebnisse zeigen, dass der Naturstoff (-)-A26771B (**1**) erst bei einer sehr hohen Konzentration von 100 µM einen erkennbaren Einfluss auf das Wurzelwachstum hat. Da ein Nachteil aller Wurzelwachstumsassays darin liegt, dass Stressfaktoren wie z.B. Lösungsmittel oder Salze das Wurzelwachstum hemmen, nimmt somit automatisch die Länge der Primärwurzeln als auch die Dichte der Lateralwurzeln ab. Dieses scheint beim Test von **1** ebenfalls der Fall zu sein. Da auch eine Expression von Markergenen und ein Assay zur Bestimmung des Kalziumeinstroms keinen Effekt von **1** zeigten, ist mit hoher Wahrscheinlichkeit die hohe Sondenkonzentration als ein Stressfaktor für die Pflanzen und deren Auswirkung auf das Wurzelwachstum zu sehen. Nichtsdestotrotz ist Stressauslösung im Allgemeinen eine eher unspezifische Bioaktivität, so dass zusammenfassend für den Naturstoff **1** keine besondere biologische Aktivität in *Arabidopsis thaliana* gefunden werden konnte.

## Ergebnisse und Diskussionen

### 3.2 Adaption der etablierten Syntheseroute von (-)-A26771B auf die Synthese der Cladospoliden B-D

Aufgrund der strukturellen Gemeinsamkeiten der Cladospoliden B-D mit dem Antibiotikum (-)-A26771B (**1**) wurde versucht, die für (-)-A26771B (**1**) etablierte Synthese auch auf die Synthese der Cladospoliden B-D aus der Cladospoliden-Familie zu übertragen (Abb. 38).



**Abb. 38:** Übersicht über die Cladospoliden B (**25**), C (**26**) und D (**27**).

Die Cladospoliden B-D sind 12-gliedrige Makrolide, welche aus verschiedenen *Cladosporium*-Spezies isoliert wurden <sup>[122-124]</sup>:

- Cladospolide B: *Cladosporium cladosporioides* FI-113
- Cladospolide C: *Cladosporium tenuissimum*
- Cladospolide D: *Cladosporiumspore chains of strain* FT-0012

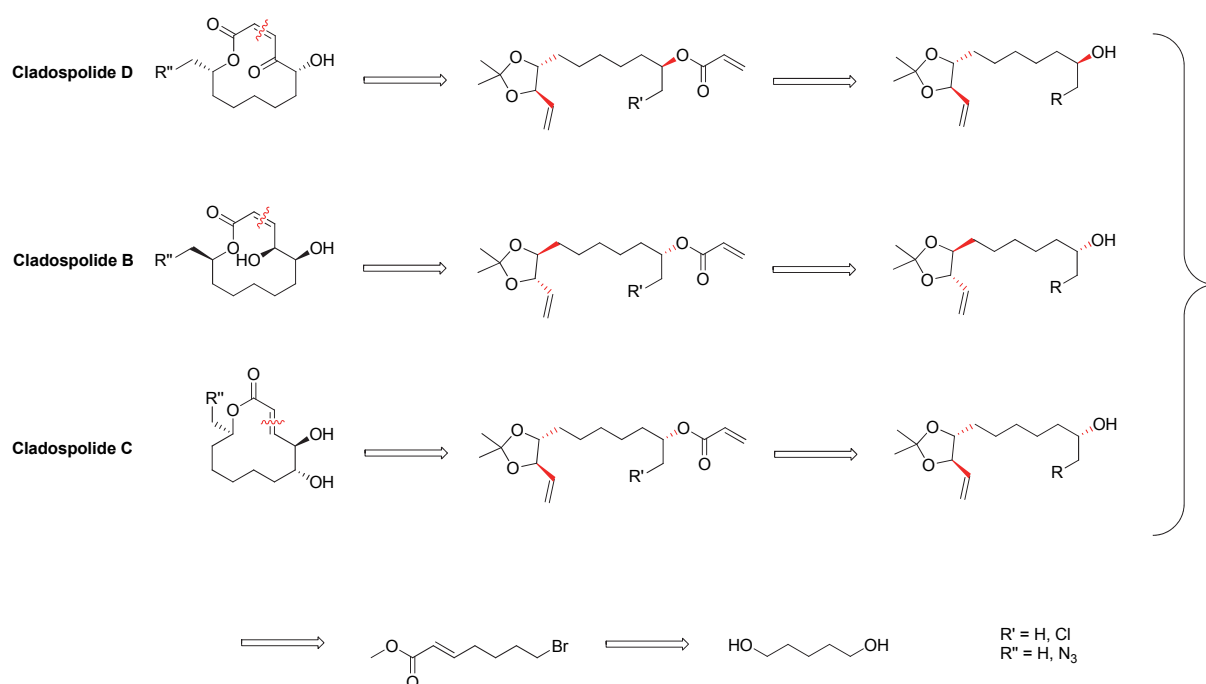
Die verschiedenen Cladospolide agieren dabei als Pflanzenhormon-Modulatoren <sup>[125]</sup>. So inhibieren die Cladospoliden B und C z.B. die Wachstumsstreckung in Reissetzlingen. Cladospolid B hat zudem einen negativen Effekt auf das Wurzelwachstum von Salatsetzlingen, während Cladospolid D eine immunitätsauslösende Wirkung besitzt (IC<sub>50</sub> von 0.1 bei einer Konzentration von 29 µg/mL gegen *Mucor racemosus*, ein Schimmelpilz der Gattung der Zygomyceten, und *Pyricularia oryzae*, einem Reispfaden). Des Weiteren hemmt Cladospolid C die Gibberellin Biosynthese. Gibberelline sind eine Klasse von Phytowachstumshormonen, welche auf einem Diterpengerüst basieren <sup>[126]</sup>.

Bei der retroanalytischen Analyse zur Synthese der drei Cladospoliden **25** - **27** (Abb. 39) fällt neben dem abweichenden Grundgerüst ((-)-A26771B basiert auf einem 16-gliedrigen-Macrocyclus, währenddessen die Cladospolide auf einem 12-gliedrigen Ringsystem basieren) vor allem die im Vergleich zu **1** fehlende Seitenkette auf. Eine weitere Änderung gegenüber dem Naturstoff (-)-A26771B (**1**)



## Ergebnisse und Diskussionen

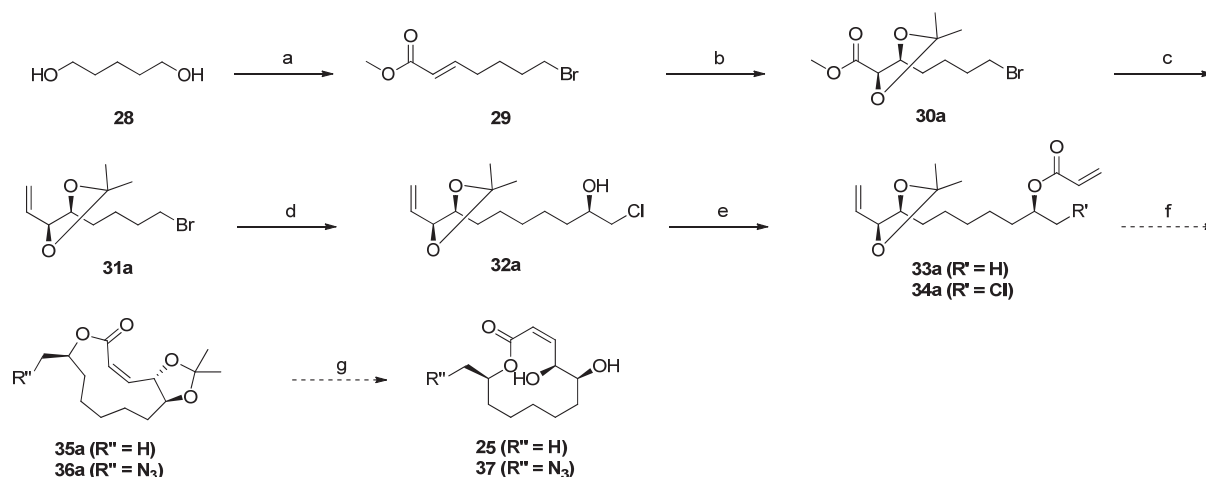
besteht in der Konfiguration der Doppelbindung bei den Cladospoliden B und D. Während sowohl (-)-A26771B (**1**) als auch Cladospolid C eine (*E*)-Konfiguration aufweisen, ist die Konfiguration bei den beiden anderen Cladospoliden B und D in der (*Z*)-Konfiguration angeordnet. Die Stereochemie der Methylgruppe (C12) ist im Falle der Cladospoliden B und C analog dem Antibiotikum **1** (*R*)-Konfiguriert, beim Cladospolide D hat das Stereozentrum eine (*S*)-Konfiguration. Verglichen mit der Stereochemie von (-)-A26771B (**1**), welches am (C5) eine (*S*)-Konfiguration besitzt, weisen die Cladospoliden C und D hier ebenfalls eine (*S*)-Konfiguration auf. Lediglich bei Cladospolide B ist die Alkoholgruppe an der (C5)-Position (*R*)-konfiguriert. Der letzte strukturelle Unterschied besteht darin, dass nur das Cladospolid D ein doppeltes Michael-System als reaktives Zentrum analog dem 16-gliedrigen Makrolid **1** besitzt, während bei den Cladospoliden B und C eine Alkoholfunktion an der Position (C4) vorliegt.



**Abb. 39:** Retrosynthese der Cladospoliden B-D ( $\text{R}', \text{R}'' = \text{H}$ ) und deren Azid-versehenen Derivaten ( $\text{R}' = \text{Cl}, \text{R}'' = \text{N}_3$ ).

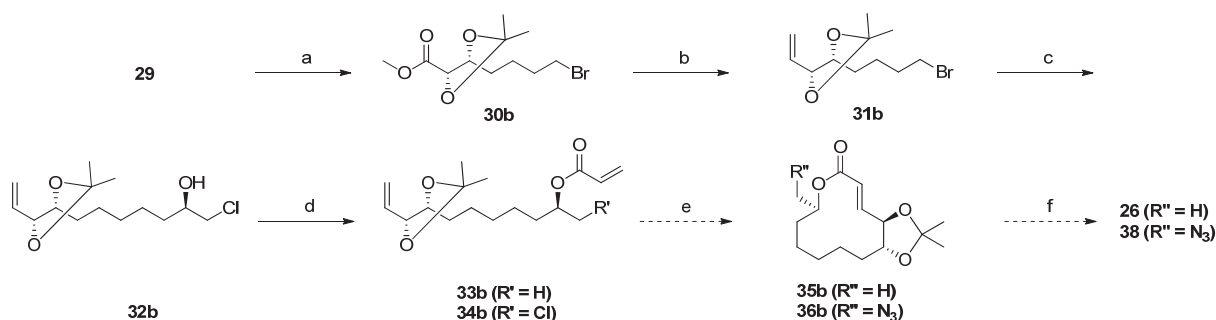
## Ergebnisse und Diskussionen

Trotz dieser strukturellen Unterschiede sind im retrosynthetischen Sinne die Cladospolide dem Naturstoff (-)-A26771B sehr ähnlich und können somit prinzipiell analog der bereits etablierten Syntheseroute für **1** synthetisiert werden (Abb. 39). Die drei Naturstoffe können zudem alle aus einer gemeinsamen, linearen Vorstufe, (*E*)-Methyl 7-bromohept-2-enoat (**29**), durch gezielte Einführung der jeweiligen Stereochemie hergestellt werden, welches sich wiederum aus 1,5-Pentandiol (**28**) synthetisieren lässt. Da eine Syntheseroute für die Darstellung von **25** - **27** analog der Synthese von **1** etabliert werden sollte, sollte hier auf dieselben Reaktionsbedingungen und Reagenzien wie bei der bereits unter **3.1** beschriebenen Synthese zurückgegriffen werden. Analog zu **1** sollten neben den drei Naturstoffen auch hier die entsprechenden Azid-versehenen Naturstoffe synthetisiert werden (Abb. 40-42).

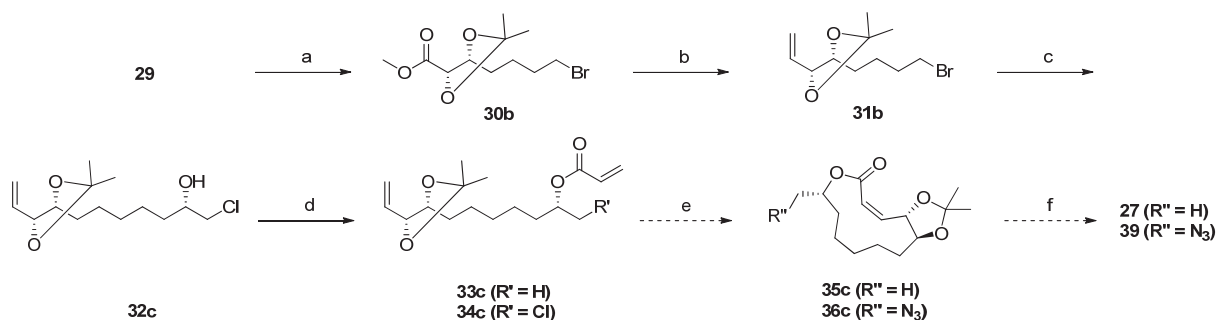


**Abb. 40:** Geplante Syntheseroute zur Darstellung des Naturstoffes Cladospolid B (**25**) und einem N<sub>3</sub>-modifizierten Derivat (**37**). Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) i. HBr, Toluol, 3 d, 130 °C; ii. PCC, DCM, 4 h, RT; iii. Ph<sub>3</sub>PCCOOMe, DCM, 12 h, RT (63 %); (b) i. AD-Mix α, <sup>t</sup>BuOH/H<sub>2</sub>O (1:1), 24 h, 0 °C; ii. Dimethoxypropan, Aceton, *p*TsOH, 60 °C, 1 h (78 %); (c) i. DIBAL-H, Toluol, 3 h, -78 °C; ii. n-BuLi, Ph<sub>3</sub>PMeBr, 12 h, -20 °C bis RT (46 %); (d) i. Rieke-Mg, THF, 1 h, RT; ii. (*R*)-(-)-Epichlorhydrin, Cu(I)I, THF, 3 h, -50 °C bis -30 °C (45 %); (e) i. (nur **33a**) LiAlH<sub>4</sub>, THF, 12 h, RT; ii. Acryloylchlorid, DCM, DIPEA, 4 h, 0 °C (35 % (**33a**), 48 % (**34a**)); (f) i. Grubbs 2<sup>nd</sup> Generation-Katalysator, DCM, 50 °C, 20 h; ii. (nur **36a**) NaN<sub>3</sub>, DMF, 48 h, 100 °C; (g) TFA, MeCN/H<sub>2</sub>O (2:1), 1 h, RT.

## Ergebnisse und Diskussionen



**Abb. 41:** Geplante Syntheseroute zur Darstellung des Naturstoffes Cladospolid C (**26**) und einem N<sub>3</sub>-modifizierten Derivat (**38**). Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) i. AD-Mix  $\beta$ , <sup>t</sup>BuOH/H<sub>2</sub>O (1:1), 24 h, 0 °C; ii. Dimethoxypropan, Aceton, *p*TsOH, 60 °C, 1 h (72 %); (b) i. DIBAL-H, Toluol, 3 h, -78 °C; ii. *n*-BuLi, Ph<sub>3</sub>PMeBr, 12 h, -20 °C bis RT (57 %); (c) i. Rieke-Mg, THF, 1 h, RT; ii. (*R*)-(-)-Epichlorohydrin, Cu(I)I, THF, 3 h, -50 °C bis -30 °C (48 %); (d) i. (nur **33b**) LiAlH<sub>4</sub>, THF, 12 h, RT; ii. Acryloylchlorid, DCM, DIPEA, 4 h, 0 °C (66 % (**33b**), 92 % (**34b**)); (e) i. Grubbs 2<sup>nd</sup> Generation-Katalysator, DCM, 50 °C, 20 h; ii. (nur **36b**) NaN<sub>3</sub>, DMF, 48 h, 100 °C; (f) TFA, MeCN/H<sub>2</sub>O (2:1), 1 h, RT.



**Abb. 42:** Geplante Syntheseroute zur Darstellung des Naturstoffes Cladospolid D (**27**) und einem N<sub>3</sub>-modifizierten Derivat (**39**). Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) i. AD-Mix  $\beta$ , <sup>t</sup>BuOH/H<sub>2</sub>O (1:1), 24 h, 0 °C; ii. Dimethoxypropan, Aceton, *p*TsOH, 60 °C, 1 h (72 %); (b) i. DIBAL-H, Toluol, 3 h, -78 °C; ii. *n*-BuLi, Ph<sub>3</sub>PMeBr, 12 h, -20 °C bis RT (57 %); (c) i. Rieke-Mg, THF, 1 h, RT; ii. (*S*)-(+)-Epichlorohydrin, Cu(I)I, THF, 3 h, -50 °C bis -30 °C (54 %); (d) i. (nur **33c**) LiAlH<sub>4</sub>, THF, 12 h, RT; ii. Acryloylchlorid, DCM, DIPEA, 4 h, 0 °C (54 % (**33c**), 73 % (**34c**)); (e) i. Grubbs 2<sup>nd</sup> Generation-Katalysator, DCM, 50 °C, 20 h; ii. (nur **36c**) NaN<sub>3</sub>, DMF, 48 h, 100 °C; (f) i. TFA, MeCN/H<sub>2</sub>O (2:1), 1 h, RT; ii. TEMPO, *p*-TsOH, DCM, 5 h, RT.

Die Synthese des linearen Fragmentes **33a-c** bzw. **34a-c** ausgehend von **28** verlief analog der Synthese des Antibiotikums **1** in ähnlich guten Ausbeuten. Dabei wurde zuerst 1,5-Pentandiol (**28**) mit Bromwasserstoffsäure zu 5-Brompentanol (**95**) umgesetzt. Der freie Alkohol wurde dann mittels Pyridiniumchlorochromat zum

## Ergebnisse und Diskussionen

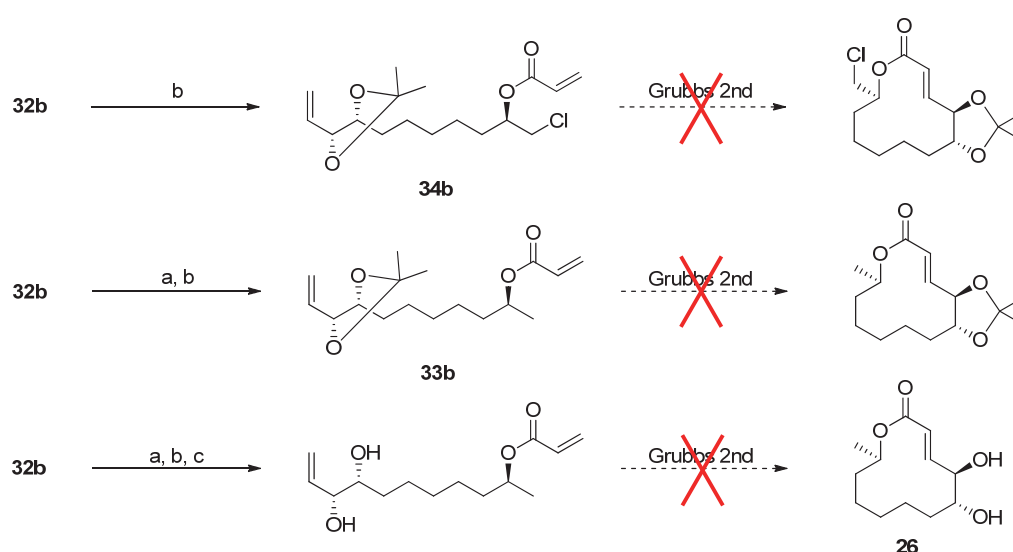
---

Aldehyd **96** oxidiert. Ausgehend von diesem Aldehyd erfolgte in einer Wittigreaktion die Umsetzung mit (Methoxycarbonylmethylen)-triphenylphosphoran zum Methylester **29**. Im nächsten Schritt wurde eine Sharpless-Dihydroxylierung sowohl mit einem AD-Mix  $\alpha$  (zu **97a**) als auch mit einem AD-Mix  $\beta$  (zu **97b**) durchgeführt. Dabei fiel auf, dass die Umsetzung von **29** mit AD-Mix  $\alpha$  zu **97a** die leicht besseren Ausbeuten lieferte als die analoge Reaktion mit dem AD-Mix  $\beta$  zu **97b**. Nachfolgend wurden die beiden Alkoholfunktionen mit 2,2-Dimethoxypropan und katalytischen Mengen *p*TsOH in Aceton als Ketal geschützt (**30a** und **30b**). Eine anschließende Reduktion der Methylester **30a** und **30b** mit DIBAL-H führte zu den entsprechenden Aldehyden **98a** und **98b**. Dabei stellte sich heraus, dass die direkte Reduktion mit dem (4*S*,5*R*)-Isomer (**98b**) in besseren Ausbeuten verlief als beim entsprechenden (4*R*,5*S*)-Isomer (**98a**). Nach der Umsetzung mit Methyltriphenylphosphoniumbromid, welches mit *n*-BuLi in das entsprechende Ylid überführt wurde, erhielt man die beiden linearen Vorstufen **31a** und **31b**, welche im nächsten Schritt in ein Grignard-Reagenz überführt und mit dem entsprechenden Epichlorhydrin-Derivat umgesetzt wurden. So wurde **31a** mit (*R*)-(-)-Epichlorhydrin zu **32a** umgesetzt, während eine Umsetzung von **31b** mit (*R*)-(-)-Epichlorhydrin die Verbindung **32b** bzw. mit (*S*)-(+)-Epichlorhydrin **32c** lieferte. Die Reaktion lieferte in allen drei Umsetzungen ähnliche Ausbeuten wie bei der Synthese von (-)-A26771B (**1**). Im Anschluss an die Grignard-Reaktion erfolgte zur Synthese der Naturstoffe die selektive Dehalogenierung aller drei Verbindungen mit LAH zu den Intermediaten **99a-c**, welche im Anschluss mit Acryloylchlorid und einer Base zu den entsprechenden, linearen Fragmenten **33a-c** für die ringschließende Metathese umgesetzt wurden. Parallel erfolgte die direkte Umsetzung von **32a-c** mit Acryloylchlorid unter basischen Bedingungen zu den halogenierten, linearen Fragmenten **34a-c**, wiederum als Vorstufe für eine nachfolgende, ringschließende Metathese. Hierbei konnten verschieden gute Ausbeuten für die drei Isomere beobachtet werden. Während bei **34b** eine gute Ausbeute von 92% isoliert werden konnte, so waren es bei **34c** noch 73 %, bei **34a** hingegen nur noch 48 %. Da diese Ergebnisse reproduzierbar waren, kann auf einen direkten Einfluss der Stereochemie der einzelnen Isomere bei dieser Reaktion geschlussfolgert werden.

Die geplante ringschließende Metathese zum Makrolid gelang jedoch unerwarteterweise bei keinem der sechs Ausgangssubstanzen (**33a-c** und **34a-c**), vermutlich aufgrund der stärkeren Ringspannung der nur 12-gliedrigen Ringe. Um

## Ergebnisse und Diskussionen

eventuell die Ringspannung zu reduzieren und somit eine Ringschließung über eine RCM dennoch zu ermöglichen, wurde in weiteren Experimenten die Ketalgruppe vor der Metathesereaktion entfernt. Jedoch konnten auch diese Ausgangsmaterialien nicht zu den gewünschten Makroliden umgesetzt werden. Daher wurden in einem letzten Versuch sowohl entschützte als auch dehalogenierte Fragmente in einer Metathesereaktion eingesetzt. Aber auch in diesem Fall konnten die gewünschten Makrolide nicht isoliert werden. Exemplarisch sollen die getesteten Bedingungen für einen erfolgreichen Ringschluss mittels der Ringschließenden Metathese am Beispiel der Synthese von Cladospolid C gezeigt werden (Abb. 43).



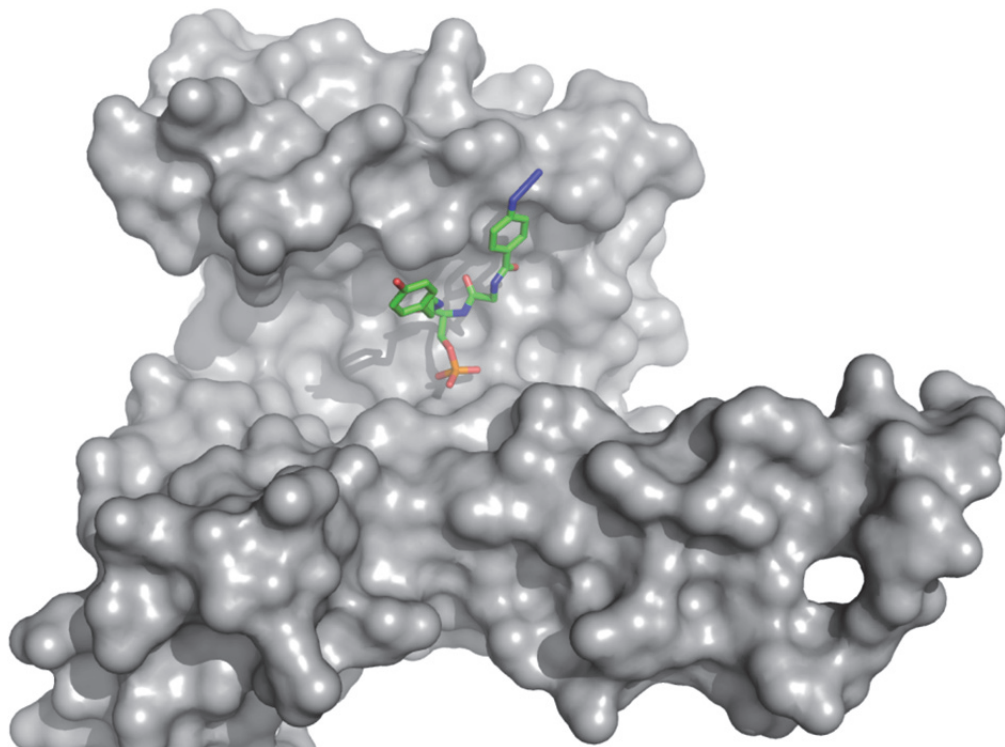
**Abb. 43:** Versuche zur Durchführung der ringschließenden Metathese am Beispiel der Synthese von Cladospolid C. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a)  $\text{LiAlH}_4$ , THF, 12 h, RT; (b) Acryloylchlorid, DCM, DIPEA, 4 h, 0 °C; (c) TFA, MeCN/ $\text{H}_2\text{O}$  (2:1), 1 h, RT.

Somit konnte gezeigt werden, dass die etablierte Syntheseroute des Naturstoffes (-)-A26771B (1) vermutlich aufgrund sterischer Effekte nicht direkt für die Synthese der kleineren Makrolide der Gruppe der Cladospoliden B-D adaptiert werden kann. Eine Synthese der Cladospolide B bis D ist aber beispielsweise über eine von Xing publizierte, sterisch weniger anspruchsvollere Macrolactonisierung möglich <sup>[125]</sup>.

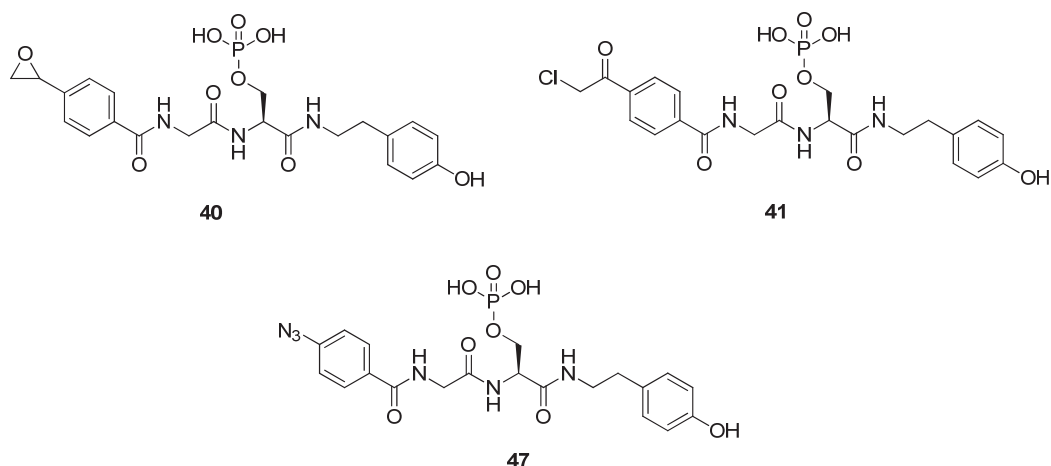
## Ergebnisse und Diskussionen

### 3.3 Synthese von 14-3-3 Protein-Protein-Wechselwirkung Inhibitoren

Die Arbeitsgruppe um Shao Q. Yao veröffentlichte 2010 einen zellgängigen Protein-Protein-Interaktions-Inhibitor **47** (Abb. 45), welcher als 14-3-3-Pan-Inhibitor die Wechselwirkung aller 14-3-3 Proteine mit ihren Bindungspartner unterbindet <sup>[111]</sup>. Dabei wurde von der Arbeitsgruppe Yao postuliert, dass der Inhibitor **47** linear im 14-3-3 Protein gebunden wird. Die Arbeitsgruppe um Dr. Christian Ottmann vom Chemical Genomics Center der Max-Planck-Gesellschaft, Dortmund, konnte durch Co-Kristallisationsexperimente allerdings zeigen, dass der von Yao synthetisierte Inhibitor **47** nicht linear sondern in einer Art U-Form die 14-3-3 Proteine bindet, bei welcher der Serinphosphatrest in die Phosphatbindestelle der 14-3-3-Proteine bindet, während die beiden Enden in entgegengesetzter Richtung gebunden sind (Abb. 44). Da die Kristallstruktur des Weiteren zeigt, dass am N-Terminalen Ende des Inhibitors ein beweglicher Aspartat-Rest sitzt, welcher prinzipiell mit einer reaktiven elektrophilen Gruppe unter Ausbildung einer kovalenten Gruppe reagieren könnte, sollte in dieser Arbeit ein neuer, auf der Struktur des Yao-Inhibitors basierender, jedoch potentiell kovalent-wirkender Inhibitor **40** (Abb. 45) synthetisiert werden; dabei sollte die mögliche Interaktion mit dem Aspartat-Rest ausgenutzt werden.

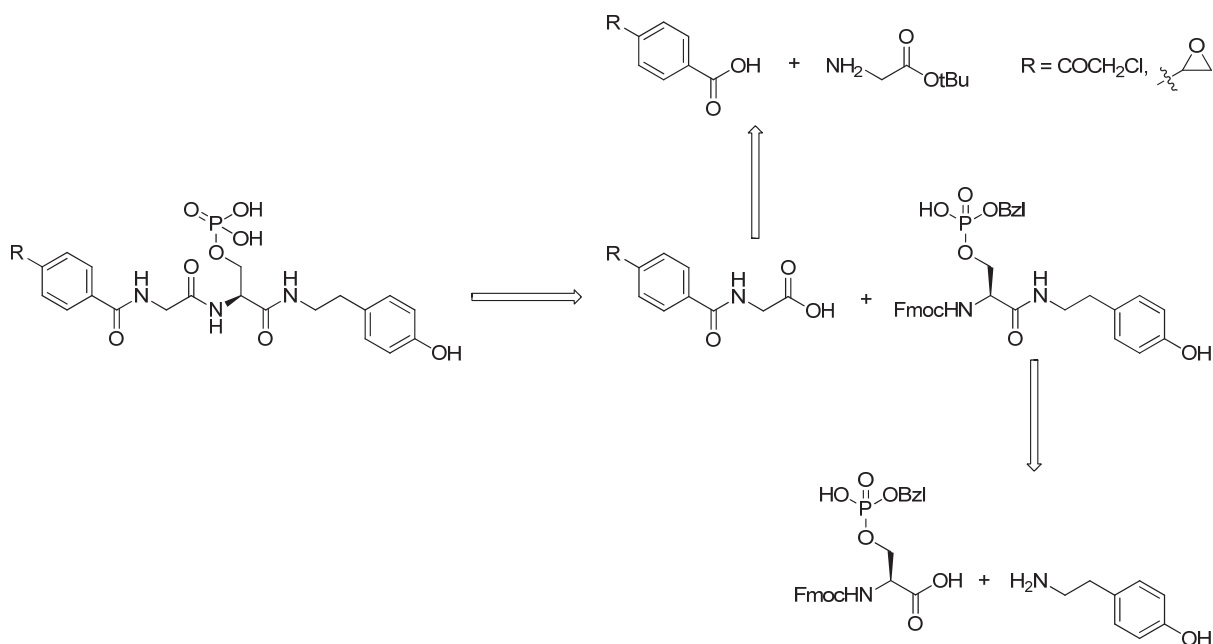


**Abb. 44:** Bindungsmodus von **47** mit 14-3-3 Proteinen (Experiment durch Ottmann 2012).



**Abb. 45:** Potentielle Inhibitoren für 14-3-3 Proteine.

Dementsprechend wurde ein Epoxid-enthaltender Inhibitor **40** entworfen (Abb. 45). Des Weiteren wurde die Synthese eines Halogenmethylketon-Derivates, wie z.B. ein Bromomethylketon oder Chloromethylketon als bioreaktives Element geplant. Die retrosynthetische Analyse sah vor, die Inhibitoren in zwei Fragmenten aufzubauen, welche anschließend über eine Peptidkupplung zusammengebracht werden (Abb. 46).



**Abb. 46:** Retrosynthese zur Darstellung von potentiell-bioreaktiven 14-3-3-PPI-Inhibitoren.

## Ergebnisse und Diskussionen

Während der Synthese des Bromomethylketon-Inhibitors stellte sich allerdings heraus, dass die Bromomethylketon-Einheit zu reaktiv gegenüber den verwendeten Kupplungsbedingungen war. Als Ersatz hierfür wurde die 4-(2-Bromoacetyl)benzoesäure durch Oxalylchlorid in das 4-(2-Chloroacetyl)benzoylchlorid überführt, welches dann in einer nucleophilen Substitution mit Glycin *tert*-Butylester zum gewünschten Baustein **50** reagieren konnte (Abb. 47).

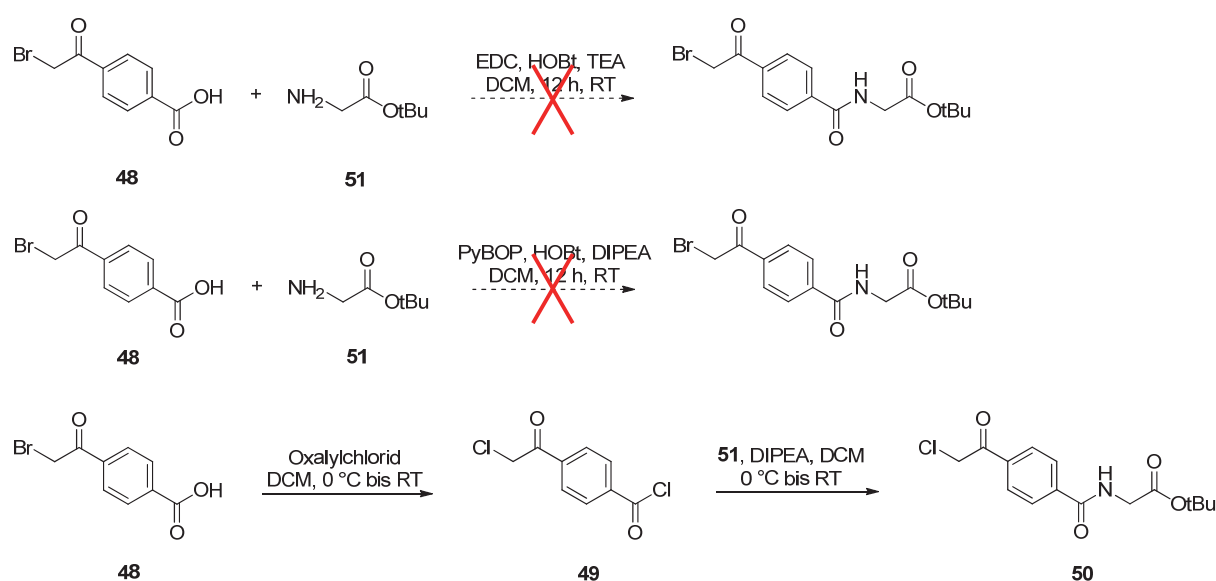
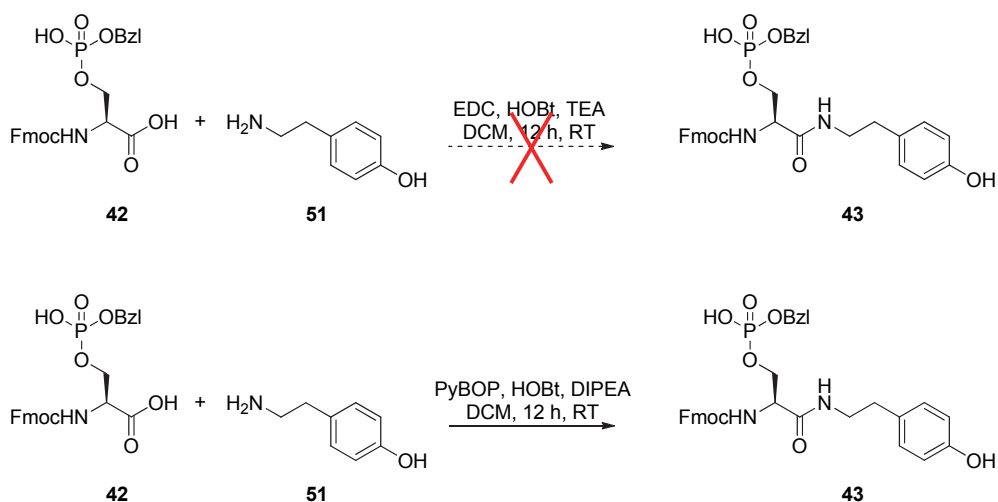


Abb. 47: Wege zur Darstellung des ersten Fragmentes **50**.

In einem nächsten Schritt wurde die Aminosäure Fmoc-Ser(PO(OH)OBzl)-OH mit Tyramin zum zweiten Fragment **43** gekuppelt (Abb. 48). Dabei stellte sich heraus, dass die Standardkupplungsbedingungen mit HOBt und EDC·HCl nicht zum gewünschten Produkt führten. Erst der Einsatz von PyBOP und HOBt lieferte hier das gewünschte Produkt **43**.

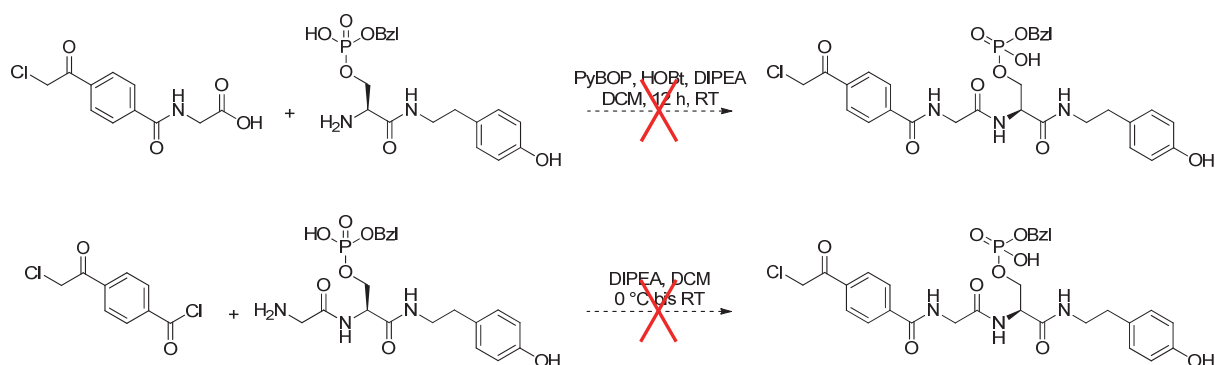


## Ergebnisse und Diskussionen



**Abb. 48:** Wege zur Darstellung des zweiten Fragmentes **43**.

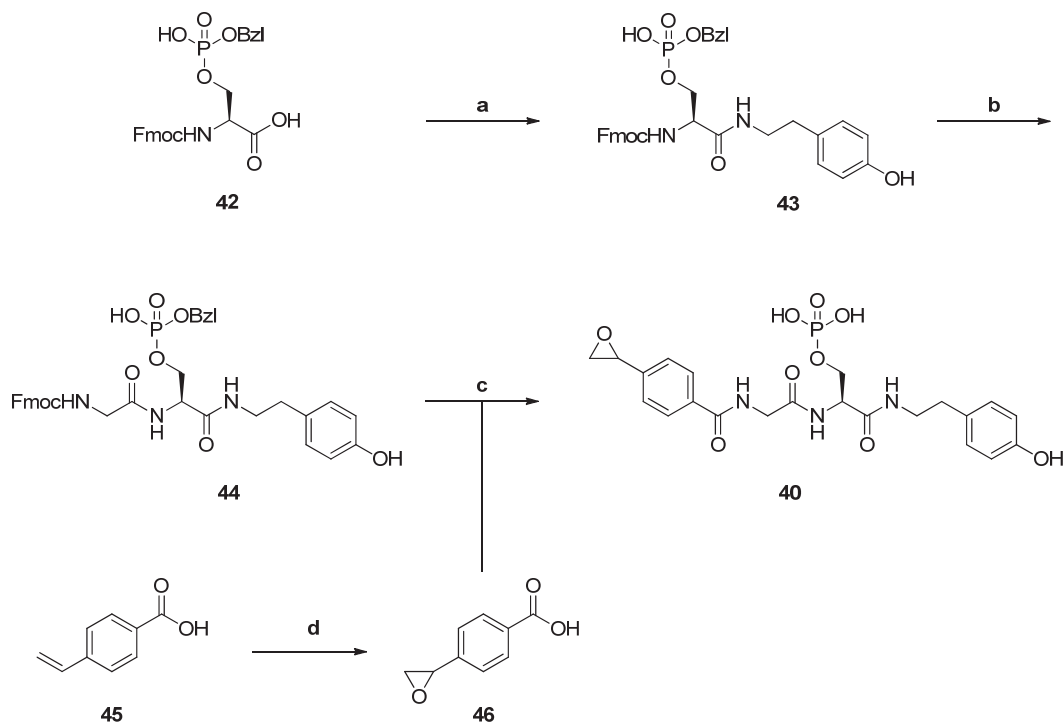
Bei der darauffolgenden Kupplung der beiden Fragmente **50** und **53** wurde beobachtet, dass die Chloromethylketoneinheit bevorzugt mit dem Phosphorsäureester des C-terminalen Fragmentes reagiert und nicht am N-terminalen Ende. Auch eine Änderung der Synthesestrategie, in welcher das Glycin zuerst an das Fragment **43** gebunden wurde, um es dann im nächsten Schritt mit dem Säurechlorid **49** reagieren zu lassen, führte nicht zu dem gewünschten Kupplungsprodukt. Aufgrund dieser unvorhergesehenen Nebenreaktion war eine Synthese von **41** über den ursprünglich-geplanten Syntheseweg leider nicht möglich (Abb. 49).



**Abb. 49:** Wege zur Synthese des geschützten Inhibitors mit einer Chloromethylketon-Einheit.

## Ergebnisse und Diskussionen

Die Synthese des Epoxid-versehenen Inhibitors **40** erfolgte ebenfalls durch eine Peptidsynthese in Lösung unter Verwendung der Kupplungsreagenzien PyBOP und HOBt (Abb. 50).

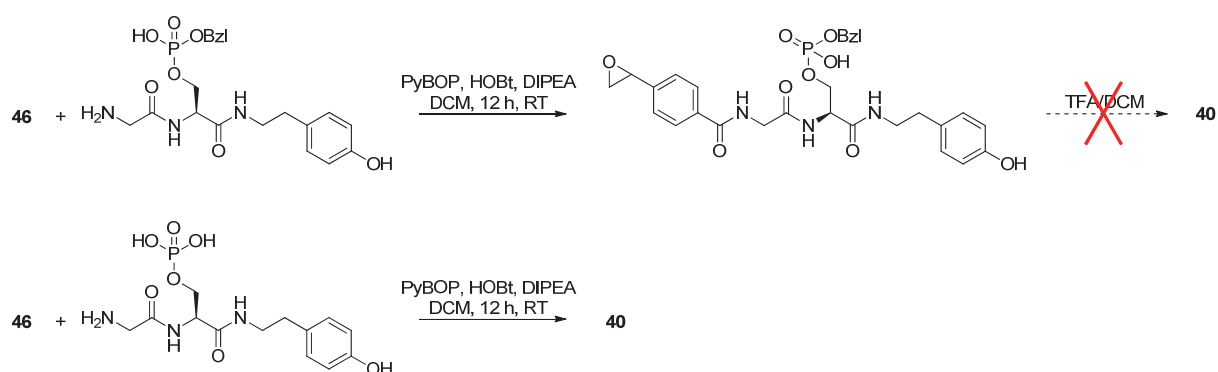


**Abb. 50:** Synthese des 14-3-3 Inhibitors **40**. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) Tyramin, PyBOP, HOBt, DIPEA, DCM, DMF, RT, 12 h; (b) i. DEA, MeCN, DMF; (ii) Fmoc-Gly-OH, PyBOP, HOBt, DIPEA, DCM, DMF, RT, 12 h (62 % über 3 Stufen); (c) i. DEA, MeCN, DMF; (ii) TFA, RT, 3 h; (iii) **46**, PyBOP, HOBt, DIPEA, DCM, DMF, RT, 12 h (54 %); (d) MnSO<sub>4</sub>, <sup>t</sup>BuOH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0.2 M NaHCO<sub>3</sub> (pH 8.0), 90 min, RT (89 %).

Hierbei wurde zuerst das Peptid **44** ausgehend von Tyramin hergestellt. Die Fmoc-Schutzgruppen wurden dabei jeweils unter milden Bedingungen für zwei Stunden bei Raumtemperatur mit Diethylamin entfernt und das Dibenzofulvene anschließend durch Ausschütteln mit Heptan entfernt. In einem ersten Versuch wurde das benzyliche Epoxid über PyBOP und HOBt an das noch Benzyl-geschützte Peptid gebunden. Eine Entschützung zum finalen Produkt **40** mit 50 % TFA in DCM lieferte anstelle des gewünschten Produktes u.a. aber nur das am Epoxid hydrolysierte Produkt. In einem neuen Versuch wurde daher an dem Peptid **44** zuerst mit Diethylamin die Fmoc-Gruppe abgespalten und in einem zweiten Schritt mit 100 % TFA die Benzylgruppe von der Phosphorsäure entfernt. Das nun komplett

## Ergebnisse und Diskussionen

entschützte Peptid wurde dann mit dem benzylichen Epoxid **46**, welches aus 4-Vinylbenzoesäure durch eine milde mangankatalysierte Umsetzung mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  in einer Ausbeute von 89 % erhalten werden konnte <sup>[127]</sup>, mittels PyBOP und HOBT zu dem gewünschten Inhibitor **40** gekuppelt. Dieser wurde anschließend säulenchromatographisch über eine C18-Kieselgelsäule aufgereinigt (Abb. 51), da eine HPLC-Aufreinigung unter sauren oder neutralen Bedingungen ebenfalls zu einer Zersetzung des Produkts führten.



**Abb. 51:** Strategie der benzylichen Entschützung bei der Synthese des 14-3-3 Inhibitors **40**.

Da die Ergebnisse der biologischen Studien jedoch zurzeit noch ausstehen, lässt sich bisher noch keine Aussage über die Effektivität des potentiellen Inhibitors **40** auf eine irreversible Inhibierung von 14-3-3 Proteinen treffen.

### 3.4 Synthese und Wirkung von 14-3-3 Fusicoccin-Derivaten als Modulatoren der 14-3-3/C-RAF Protein-Protein Wechselwirkungen

Der Ras-RAF-MAPK-Signalweg ist bei vielen Krebsarten und einigen Entwicklungsstörungen wie dem Noonan-Syndrom oder dem LEOPARD-Syndrom hyperaktiv <sup>[128]</sup>. Die C-RAF-Proteinkinase spielt dabei eine entscheidende Rolle, da sie die extrazelluläre Signalwirkung von den Rezeptortyrosinkinasen (RTKs), SOS und dem aktivierten Ras an die cytoplasmatischen Kinasen MEK und weitere extrazelluläre Signalregulierende Kinasen (ERK) weiterleitet. Diese aktivieren dann Transkriptionsfaktoren wie Elk-1, Ets und Sp1 <sup>[129]</sup>. Zur Aktivierung von C-Raf muss dieses zuerst von aktiviertem Ras an die Zellmembran rekrutiert werden <sup>[112]</sup>. Eine Bindung an 14-3-3 Proteinen, welche im Cytoplasma lokalisiert sind, unterbindet somit die Ras-C-RAF Interaktion und führt zur Hemmung der Ras-vermittelten Plasmamembranrekrutierung von C-RAF <sup>[130-131]</sup>.

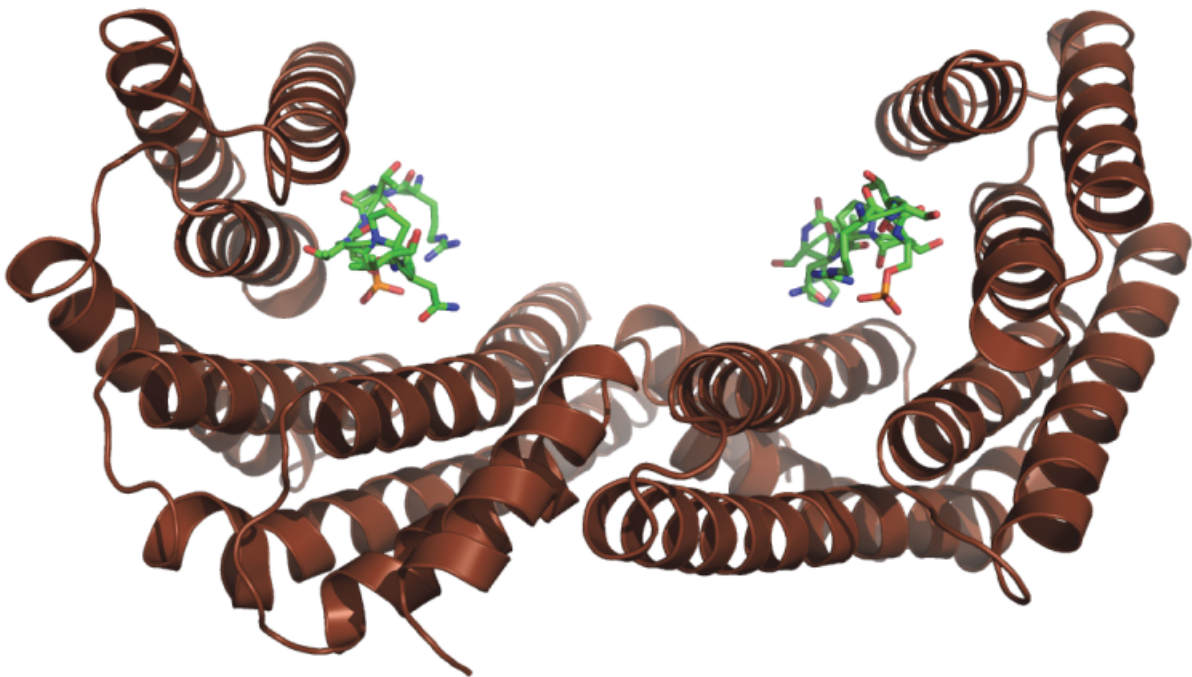
In Pflanzen bewirkt der Naturstoff Fusicoccin A eine Stabilisierung einer Interaktion von 14-3-3-Proteinen und einer in der Plasmamembran verankerten H<sup>+</sup>-ATPase <sup>[101]</sup>. Dabei konnte die molekulare Wechselwirkung zwischen Fusicoccin A und den 14-3-3-Proteinen und der H<sup>+</sup>-ATPase durch eine Röntgenkristallstrukturanalyse eines ternären Bindungskomplexes bereits auf molekulare Ebene aufgeklärt werden. Diese Studien deuten an, dass Fusicoccin-Derivate als generelle Modulatoren von 14-3-3 Protein-Protein-Wechselwirkungen wirken können <sup>[132]</sup>.

In einem Forschungsprojekt der Arbeitsgruppe Ottmann wurde nun die molekulare Basis der Hyperaktivierung von C-RAF beim Noonan-Syndrom untersucht. Diese Studie zeigte, wie die dem Noonan-Syndrom zugrundeliegenden Mutationen in der N-terminalen 14-3-3 Bindungsstelle des Raf Wildtyps (WT) eine Bindung mit 14-3-3 behindern und somit eine stärkere Bindung von C-RAF an die Plasmamembran ermöglichen <sup>[128]</sup>. Im Umkehrschluss könnte die negative Regulationsrolle von 14-3-3 Proteinen unterstützt werden, wenn die 14-3-3/C-RAF-Interaktion, z.B. durch den Protein-Protein-Komplex stabilisierende niedermolekulare Verbindungen, stabilisiert würde, was zu einer Reduktion der Hyperaktivität des Ras-RAF-MAPK-Signalweges führen sollte. Deshalb sollte in diesem Teil der Dissertation niedermolekulare Verbindungen gesucht werden, welche die Protein-Protein-Wechselwirkung von 14-3-3 mit dem N-Terminus von C-RAF stabilisieren.

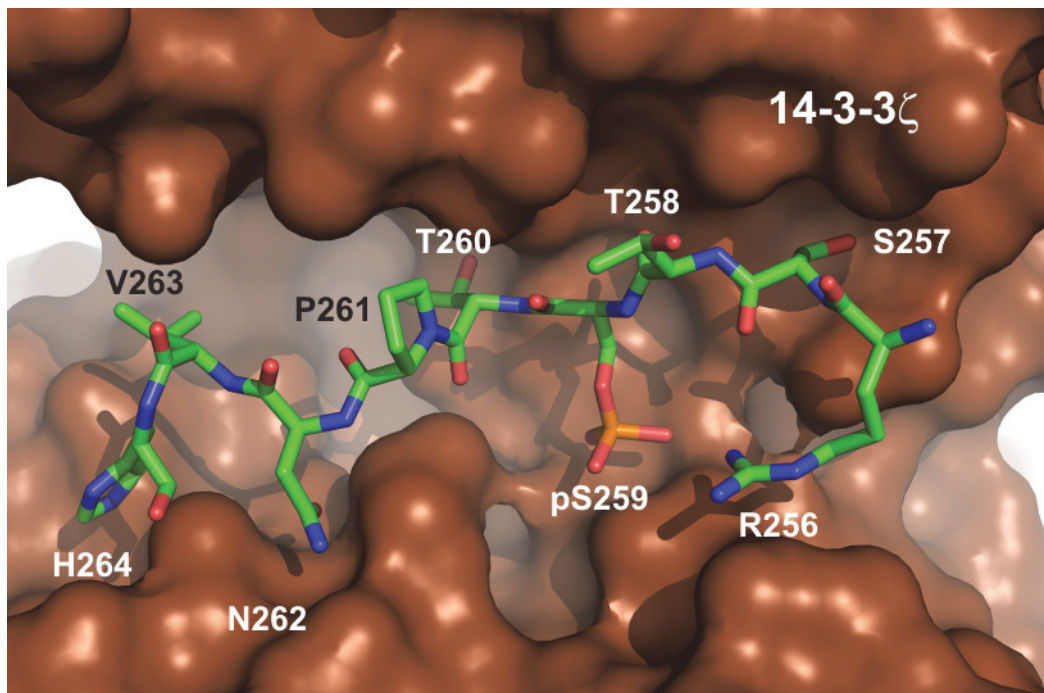
## Ergebnisse und Diskussionen

---

Strukturuntersuchungen eines 14-3-3 $\zeta$ -Dimers mit einem C-RAF-Modellpeptid offenbarten dabei den molekularen Bindungsmodus: Dabei nimmt das 14-3-3 $\zeta$ -Dimers seine charakteristische W-ähnliche Form an, so dass jedes Monomer eine amphipathische Tasche bildet, welche das C-RAF-Modellpeptid bindet (Abb. 52). Das Peptid bindet dabei in einer gestreckten Konformation in der Bindungstasche und belegt so etwa 70 % der totalen Länge dieses Ligandenbindungskanals (Abb. 53) <sup>[128]</sup>.



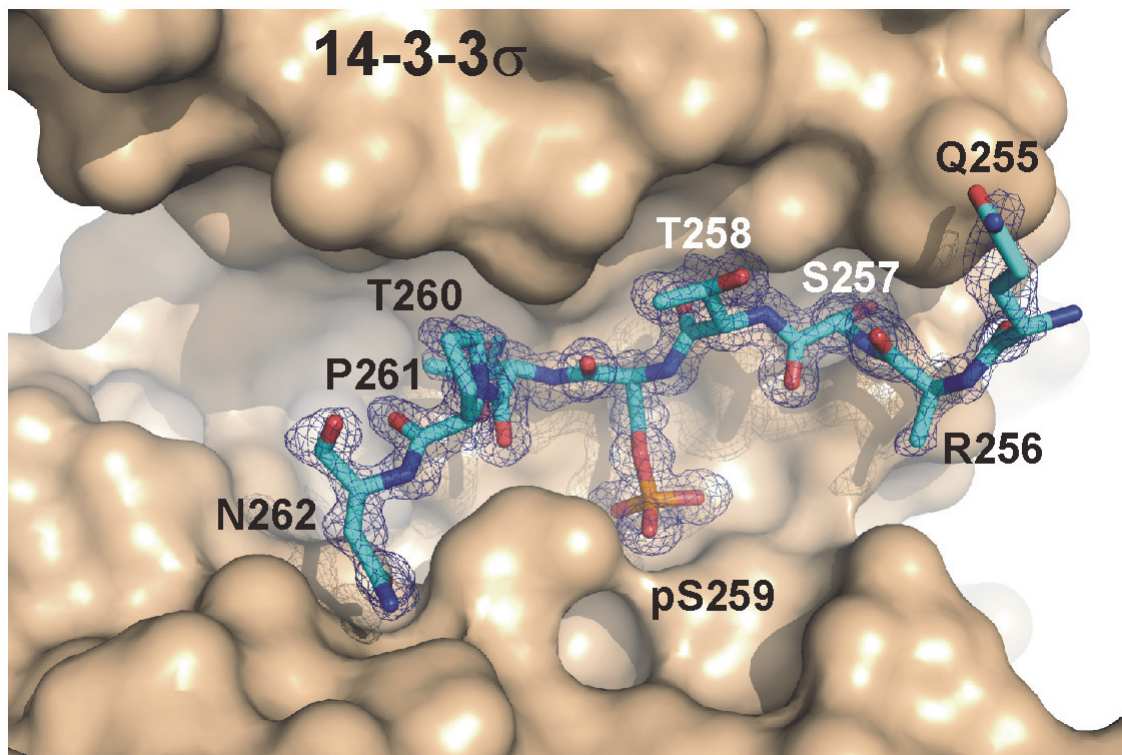
**Abb. 52:** Strukturanalyse eines 14-3-3 $\zeta$ -Dimers (braun) im Komplex mit einem C-RAFpSer<sup>259</sup> Phosphopeptid (grün) offenbart den molekularen Bindungsmodus dieser Interaktion <sup>[128]</sup>.



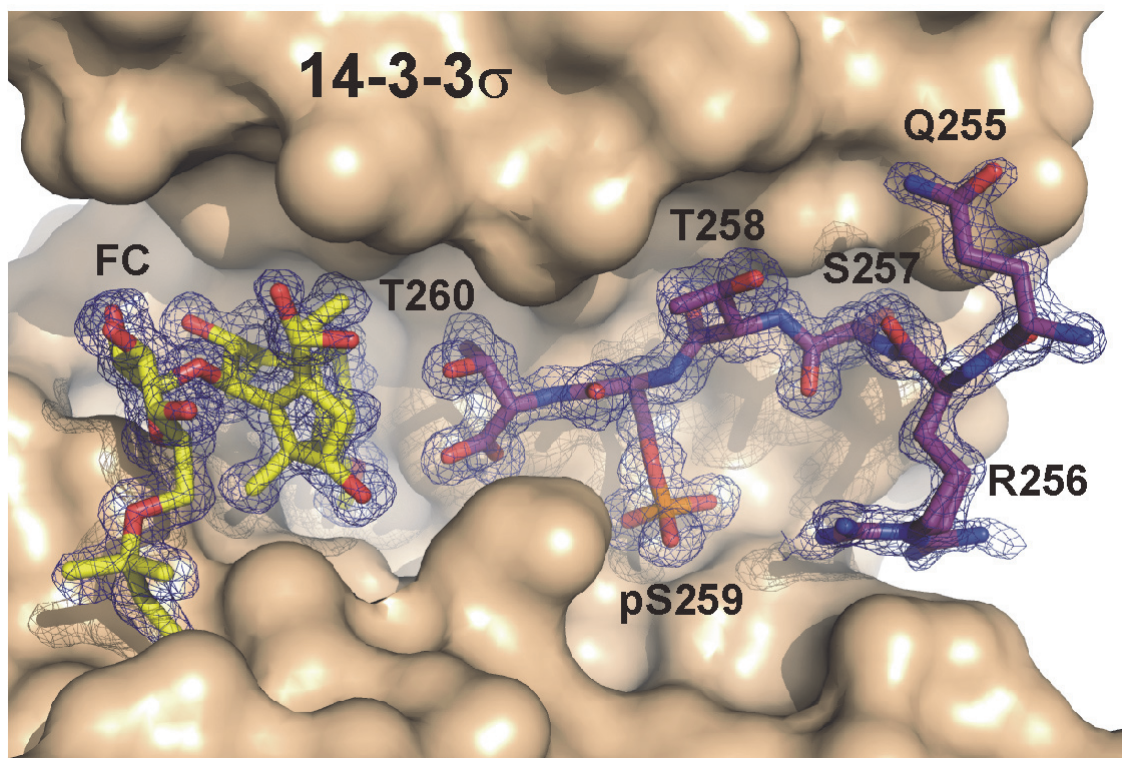
**Abb. 53:** Der molekulare Bindungsmodus des C-RAF<sup>Ser259</sup> Phosphopeptides (grün) in der 14-3-3 Bindungstasche <sup>[128]</sup>.

In einer früheren Arbeit konnte die Struktur eines 14-3-3 Protein-Komplexes mit einem von der Pflanze H<sup>+</sup>-ATPase PMA2-abgeleiteten Phosphopeptid aufgeklärt werden. Diese Protein-Protein-Interaktion wird durch den Naturstoff Fusicoccin stabilisiert <sup>[99]</sup>. Die Strukturanalyse des ternären Fusicoccin A/14-3-3/PMA2-Phosphopeptid-Komplexes zeigte dabei, dass PMA2 in der 14-3-3 Bindungsseite unter Ausbildung eines sogenannten Typ III-Motives bindet, wodurch die Bindungstasche des 14-3-3 Monomers nur zu gut  $\frac{2}{3}$  seiner Länge ausgefüllt wird. Der Naturstoff Fusicoccin A füllt jedoch den verbleibenden Rest der Protein-Protein-Grenzfläche aus und interagiert dabei gleichzeitig mit beiden Protein-Partnern. Diese Interaktion führt zu einer Stabilisierung der Protein-Protein-Interaktion. Da das C-RAF<sup>Ser259</sup> Phosphopeptid jedoch in der Form eines sogenannten Typ I Motives bindet, welches sich in der C-terminalen Richtung des phosphorylierten Serin anschließt, ist die Fusicoccin-Bindungsseite in 14-3-3 teilweise durch dieses Peptid besetzt (Abb. 53), so dass Fusicoccin aus sterischen Gründen nicht mehr an den binären 14-3-3/C-RAF<sup>Ser259</sup> Komplex binden und den 14-3-3/C-RAF Komplex stabilisieren kann (Abb. 54). Wird im Vergleich dazu ein am C-Terminus kürzeres C-RAF Phosphopeptid mit einem Typ III-Motiv verwendet, kann der binäre Komplex mit 14-3-3 hingegen das Fusicoccin mit einem  $K_d$  von 6.6  $\mu$ M binden (Abb. 55) <sup>[128]</sup>.





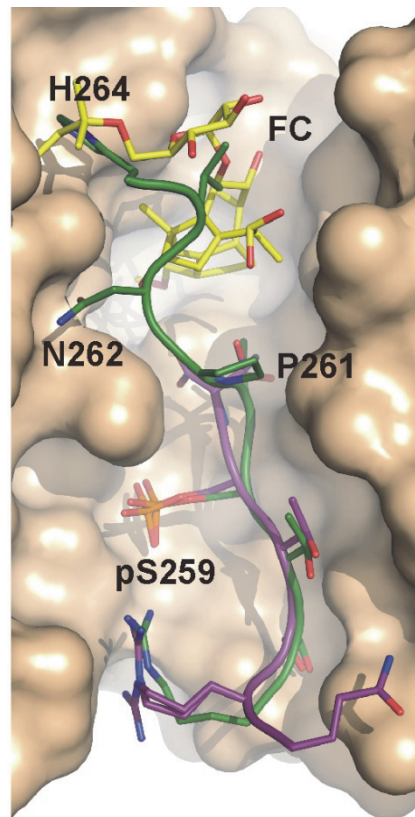
**Abb. 54:** Kristallstruktur des C-RAF-pSer<sup>259</sup> Phosphopeptides (cyan) im Komplex mit 14-3-3σ. Das Phosphopeptid bindet in die 14-3-3-Bindungstasche in der Form eines Typ I-Motives <sup>[128]</sup>.



**Abb. 55:** Kristallstruktur eines Komplexes eines verkürzten C-RAF-pSer<sup>259</sup> Phosphopeptides (magenta) mit 14-3-3σ. In diesem Fall bindet das Phosphopeptid in einer Typ III-Motiv ähnlichen Anordnung und erlaubt somit eine zusätzliche Bindung von Fusicoccin (gelb) <sup>[128]</sup>.

## Ergebnisse und Diskussionen

Bindet also das „normale“, d.h. längere C-RAF Phosphopeptid, in die 14-3-3σ-Bindungsstelle, so wird ein signifikanter Teil der Fusicoccin-Bindungsstelle durch die C-Terminal vor dem Phosphoserin liegenden Aminosäuren belegt (Abb. 56).

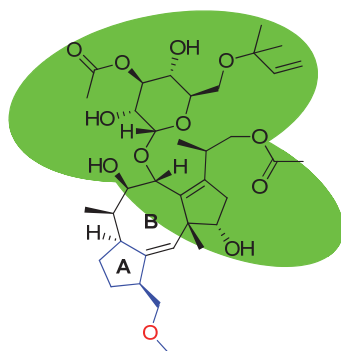


**Abb. 56:** Überlagerung des im Typ I-Motiv bindenden (nativen) C-RAFSer<sup>259</sup> Phosphopeptides (grün), des Typ III-Motiv bindenden C-RAFSer<sup>259</sup> Phosphopeptides (magenta) und Fusicoccin A (FCA) (gelb) [128]

Aufgrund dieser Bindungsdaten, die darlegen, dass der Hauptanteil des 8-gliedrigen Rings (B) sowie der komplette Teil des 5-gliedrigen A-Rings nicht mit dem C-RAFSer<sup>259</sup> Phosphopeptid kollidiert, sollte eine kleine Bibliothek von Fusicoccin-ähnlichen Derivaten synthetisiert werden, welche diesem Teil des Fusicoccins entsprechen sollten (Abb. 57A). Deshalb wurden, ausgehend von den beiden 5-Ringen Methylencyclopentan und Methyl-1-cyclopenten-1-carboxylat, verschiedene Fragmente synthetisiert, welche mindestens die Methoxycyclopentan-Einheit des Fusicoccins A beinhalten (Abb. 57B).

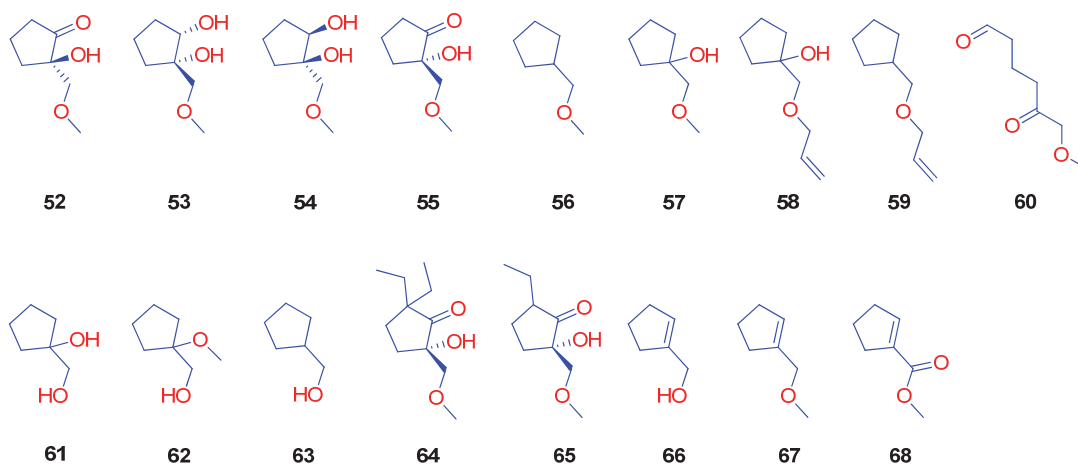


A



Fusicoccin A

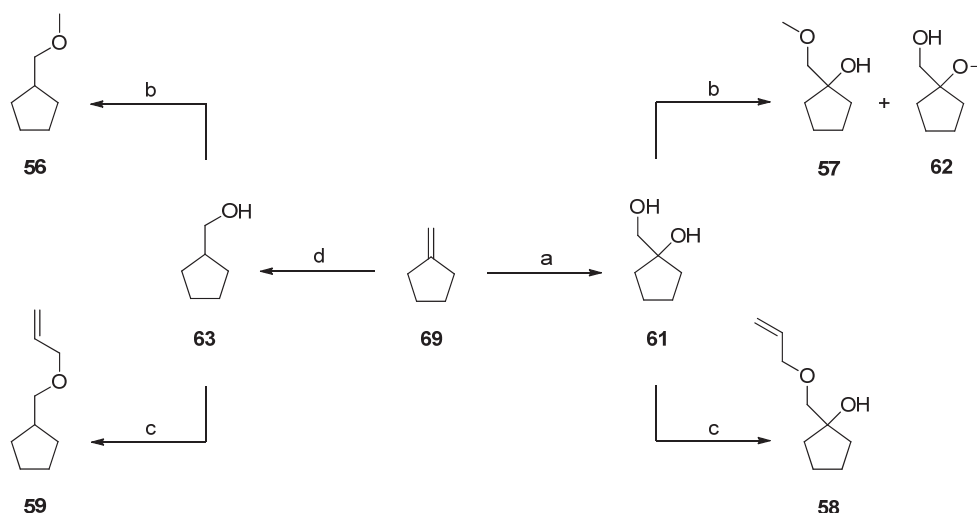
B



**Abb. 57:** (A) Struktur von Fusicoccin A. In grün sind die Molekülregionen markiert, welche mit dem QRSTpS<sup>259</sup>TPNVH-COOH Peptid im binären 14-3-3/C-RAF Komplex kollidieren würden. (B) Übersicht über die synthetisierten, Fusicoccin-ähnliche Derivate **52** - **68**.

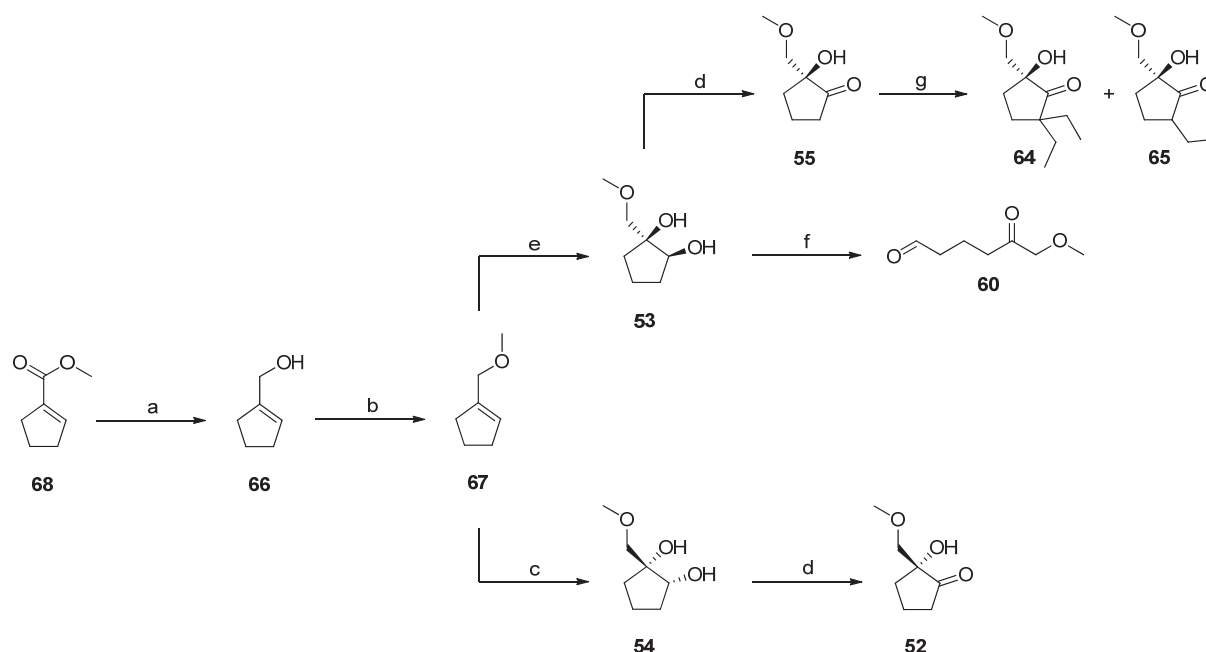
Zur Synthese der Derivate **52** bis **68** wurden zwei unterschiedliche Synthesestrategien entwickelt (Abb. 58 und 59).

## Ergebnisse und Diskussionen



**Abb. 58:** Synthese der Fusicoccin-ähnlichen Derivate **56 - 59** sowie **61 – 63**, welche auf Methylcyclopentane (**69**) als Ausgangsmaterial basieren. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a)  $\text{OsO}_4$ , NMO,  $t\text{BuOH}/\text{H}_2\text{O}$ , RT, 24 h (62 %); (b) NaH, MeI, THF, 0 °C bis RT, 3 h (14 % (**57**), 27 % (**62**), 32 % (**56**)); (c) NaH, Allylbromid, THF, 0 °C bis 50 °C, 12 h (48 % (**58**), 63 % (**59**)); (d) i.  $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$ , THF, 0 °C bis RT, 24h; ii. 1 M NaOH,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 0 °C bis RT, 20 min (49 %).

Die erste Syntheseroute zur Darstellung der Fusicoccin A-Fragmente **56**, **57**, **58**, **59**, **61**, **62** und **63** beruhte auf einer Derivatisierung von Methylcyclopentane (**69**). Dieses wurde zuerst mit Osmiumtetroxid zum entsprechenden 1-(Hydroxymethyl)cyclopentanol (**61**) oxidiert. Eine gezielte Steuerung der Konformation wurde in diesem Fall nicht verfolgt, so dass man am Ende ein racemisches Gemisch beider Enantiomeren erhielt. Eine einfache Methylierung von **61** mit Methyljodid lieferte die Monomethylether **57** und **62** im Verhältnis 1:2. Eine weitere Umsetzung des Diols **61** mit Allylbromid lieferte in qualitativen Mengen nur das an der  $\text{CH}_2\text{-OH}$  Gruppe veretherte Produkt **58**. In einem zweiten Schritt erfolgte die Oxidation des Methylcyclopentans (**69**) mit Borhydrid und anschließender, basischer Umsetzung mit Wasserstoffperoxid und Natriumhydroxid zum primären Alkohol **63**. Dieser wurde dann, analog zum Diol **61**, mit Methyljodid und Allylbromid zu den entsprechenden Ethern **56** und **59** umgesetzt.



**Abb. 59:** Synthese der Fusicoccin-ähnlichen Derivate **52** - **55**, **60** und **64** – **68**, welche aus dem Ausgangsmaterial Methyl-1-cyclopenten-1-carboxylat (**68**) erhalten wurden. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) DIBAL-H, DCM, NaOH, 2 h, -78 °C bis RT (84 %); (b) NaH, MeI, 12 h, 0 °C bis RT (79 %); (c) AD-Mix  $\beta$ , <sup>t</sup>BuOH/H<sub>2</sub>O, 12 h, RT (73 %); (d) Oxalylchlorid, DMSO, Et<sub>3</sub>N, DCM, -78 °C bis -60 °C, 2 d (54 % (**55**), 48 % (**52**)); (e) AD-Mix  $\alpha$ , <sup>t</sup>BuOH/H<sub>2</sub>O, 12 h, RT (88 %); (f) Dess-Martin-Periodinan, DCM, 3h, RT (45 %); (g) NaH, Ethyliodid, THF, 12 h, RT (14 % (**64**), 56 % (**65**)).

In der zweiten Syntheseroute erfolgte die Darstellung der Derivate **52**, **53**, **54**, **55**, **60**, **64**, **65**, **66** und **67**. Ausgehend von Methyl-1-cyclopenten-1-carboxylat (**68**) wurde zuerst Cyclopentenylmethanol (**66**) durch eine Reduktion des Methylesters mit DIBAL-H und basischer Aufarbeitung erhalten. Dieses wurde mit Methyliodid zum entsprechenden Methylether **67** umgesetzt. Der Methylether **67** wurde dann sowohl mit einem AD-Mix  $\alpha$  als auch mit einem AD-Mix  $\beta$  zu den entsprechenden, enantiomerenreinen 1,2-Diolen **53** ( $\alpha$ ) und **54** ( $\beta$ ) umgesetzt, welche in einer milden Swern-Oxidation mit DMSO und Oxalylchlorid zu den entsprechenden enantiomerenreinen Hydroxy(methoxymethyl)cyclopentanonen **52** und **55** oxidiert wurden. Eine Oxidation des 1,2-Diols **53** mit dem stärkeren Oxidationsmittel Dess-Martin-Periodinan führte hingegen zu einer Oxidation des tertiären Alkohols zum Aldehyd unter gleichzeitiger Ringöffnung zum 6-Methoxy-5-oxohexanal (**60**). Als letztes wurde (S)-2-Hydroxy-2-(methoxymethyl)cyclopentanon **55** mit Ethyliodid umgesetzt, welches an der (C2)-Position des Rings als Mono- bzw. Diethyl addierte. Man erhielt das monoalkylierte Produkt **65** in einem Verhältnis von ca. 4:1 im

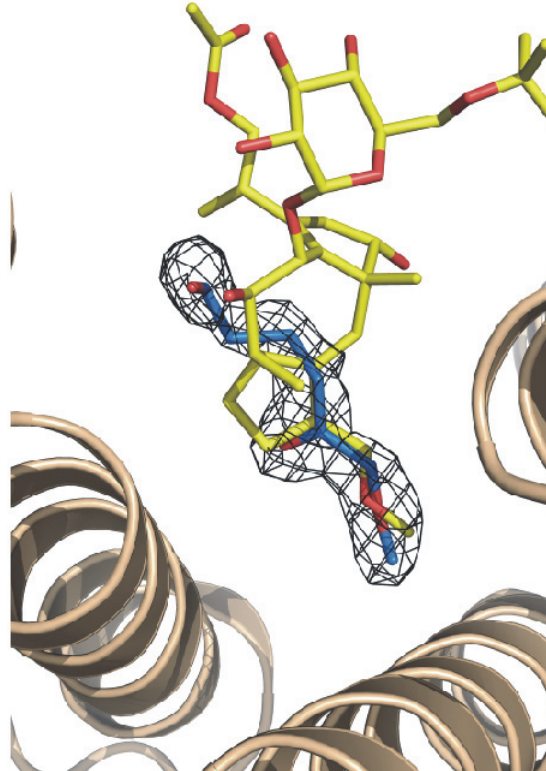
## Ergebnisse und Diskussionen

---

Vergleich zum dialkylierten Produkt **64**. Die beiden Produkte wurden anschließend säulenchromatographisch über eine Silicagelsäule getrennt.

Die geringen Siedepunkte der veretherten Cyclopentyl- und Cyclopentenylmethanole (**56**, **59**, **67**) behinderten eine effiziente Aufarbeitung und Reinigung der Produkte. Dies führte zu teilweise niedrigen Ausbeuten, da das Entfernen des Eluenten am Rotationsverdampfer nach der säulenchromatographische Reinigung teilweise mit einem Verlust des isolierten Produktes einherging. Demgegenüber lieferten Aufreinigungen des Rohproduktes mittels einer Destillation guten Ausbeuten. Da für die biologischen Studien aber jeweils nur geringe Mengen der synthetisierten Fragmente benötigt wurden und die Testung der Substanzen im Vordergrund stand, wurde in dieser Arbeit auf eine Optimierung der Syntheseroute zur Verbesserung der Produktausbeuten verzichtet.

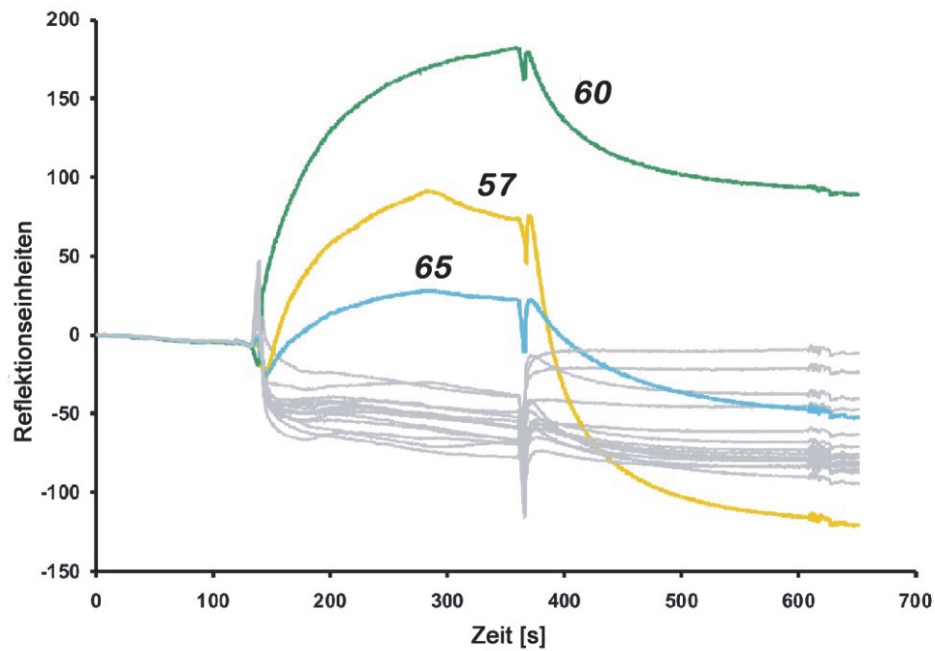
Die so synthetisierten Fragmente **52** bis **68** wurden anschließend in der Arbeitsgruppe Ottmann in einem Kristallisationspuffer mit einem binären 14-3-3/QRSTpSTPNVH-COOH-Komplex behandelt. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass unerwarteterweise das Fragment 6-Methoxy-5-oxohexanal (**60**), welches über keine Ringstruktur verfügt und als Nebenreaktion bei der eigentlichen Fragmentsynthese erhalten wurde, eine Bindung mit dem 14-3-3/QRSTpSTPNVH-COOH-Komplex eingeht. Die Substanz belegt dabei eine äquivalente Position wie der A-Ring im Fusicoccin-Naturstoff (Abb. 60) <sup>[128]</sup>.



**Abb. 60:** Überlagerte Kristallstruktur des im 14-3-3 $\sigma$ /QRSTpSTNVH-COOH - Komplex gebundenen Fragments **60** (blau) mit Fusicoccin A (gelb). Das Fragment nimmt dabei die Position des A-Ringes ein <sup>[128]</sup>.

Als nächstes wurde in der Arbeitsgruppe Ottmann mittels einer Oberflächen-Plasmon-Resonanz (*surface plasmon resonance*, SPR)-Messung getestet, wie potent die einzelnen Fragmente den 14-3-3/C-RAF-Komplex stabilisieren. Dazu wurde eine N-terminale S259D (Phosphomimickry)-Mutante von C-RAF (Einheiten 220 bis 268), welche an GST (GST-C-RAF<sub>220-268</sub>S259D) gebunden wurde, auf einer mit GST-Antikörpern beschichteten Dextranmatrix auf einem Biacore-Chip immobilisiert. Die Bindung des 14-3-3 Proteins wurde dann in Anwesenheit einer 20 mM-Lösung der Fragmente vermessen (Abb. 61) <sup>[128]</sup>.

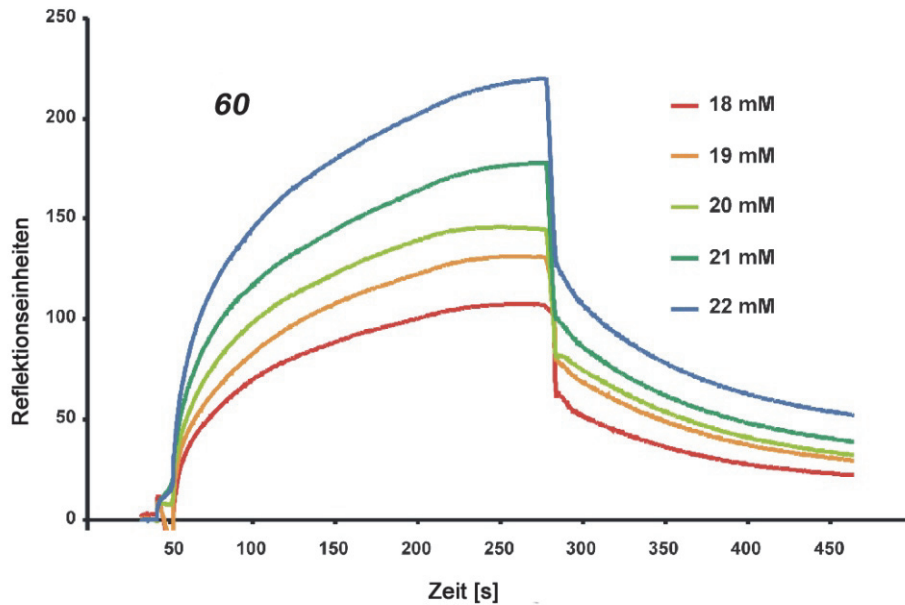
## Ergebnisse und Diskussionen



**Abb. 61:** SPR-Analyse der Fragmente **52** bis **68** auf ihre stabilisierenden Eigenschaften eines GST-C-RAF<sub>220-268</sub>S259D/14-3-3 $\sigma$ -Komplexes. Die Verbindung oder Trennung von 14-3-3 im Bezug auf das immobilisierte GST-C-RAF Konstrukt wurde in Gegenwart von 20 mM Konzentrationen der verschiedenen Fragmente gemessen. Die Bindungskurven der aktiven Substanzen sind farblich hinterlegt: **60** (grün), **57** (gelb), **65** (cyan) (modifiziert nach <sup>[128]</sup>).

Viele der getesteten Verbindungen waren nicht in der Lage, die Bindung des 14-3-3 Proteins an das C-RAF-Konstrukt zu stabilisieren. Die synthetisierten Fragmente **57**, **60** und **65** zeigten jedoch eine geringfügige Stabilisierung, wobei Fragment **60** wiederum die potentesten Eigenschaften zeigte (Abb. 61).

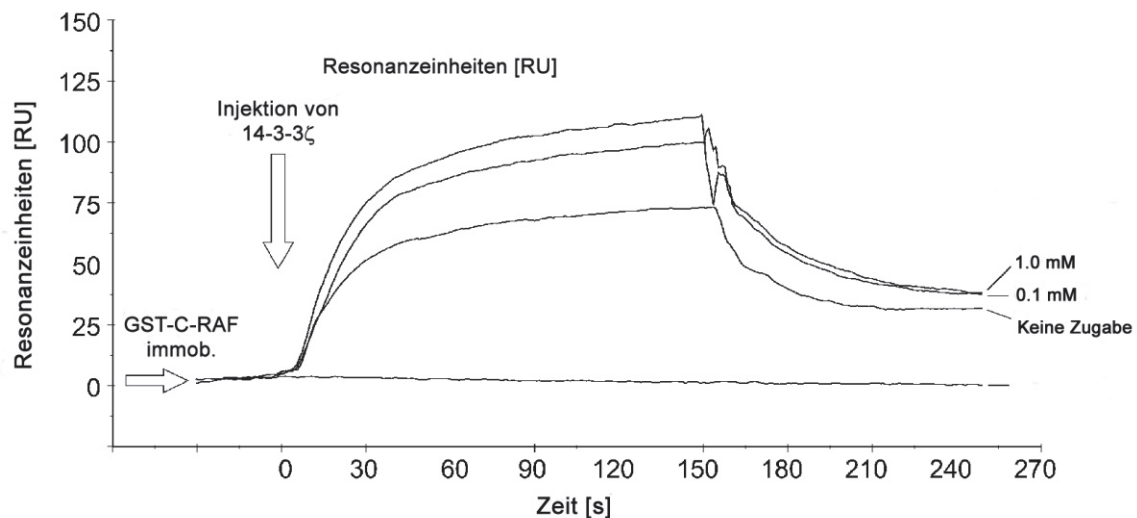
Weiterhin wurde in der Arbeitsgruppe Ottmann mit 6-Methoxy-5-oxohexanal (**60**) eine konzentrationsabhängige SPR-Messung durchgeführt, wodurch die Dissoziationskonstante  $K_D$  der Bindung abgeschätzt werden konnte. Diese liegt für das Fragment **60** im kleinen, millimolaren Bereich (Abb. 62) <sup>[128]</sup>.



**Abb. 62:** SPR-Analyse der Bindung von **60** an den binären Komplex (modifiziert nach <sup>[128]</sup>).

Um die mit Fragment **60** und dem Phosphomimickry-C-RAF-Konstrukt (GST-C-RAF-<sub>220-268</sub>S259D) gefundenen Ergebnisse zu bestätigen, wurde in der AG Ottmann noch ein analoges Experiment mit C-RAF durchgeführt, welches die volle Länge besitzt. Dabei zeigte sich, dass die Assoziation des 14-3-3 Proteins mit C-RAF um einiges verbessert wurde, während die Dissoziationsraten keine substantiellen Unterschiede zeigen. In Abb. 63 ist gezeigt, dass eine Stabilisierung der C-RAF/14-3-3 Wechselwirkung durch 6-Methoxy-5-oxohexanal (**60**) bereits bei einer Konzentration von 100  $\mu$ M erfolgte <sup>[128]</sup>.

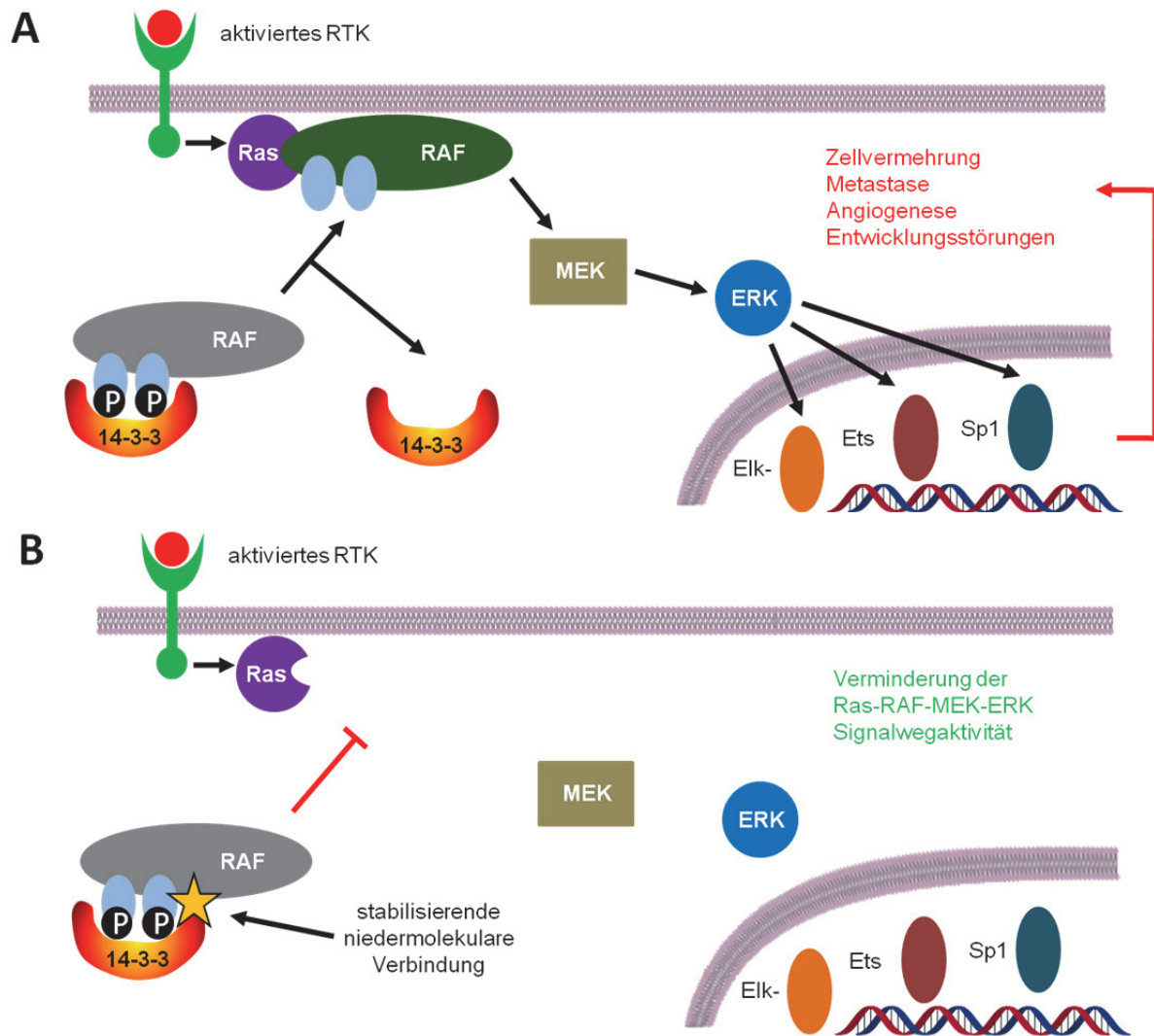
## Ergebnisse und Diskussionen



**Abb. 63:** Stabilisierung der Wechselwirkung zwischen 14-3-3 und Volllängen-C-RAF durch das Fusicoccin A Fragment **60**. SPR-Analyse der konzentrationsabhängigen Aktivität von **60**. Der Effekt der durch **60**-induzierten Stabilisierung der C-RAF/14-3-3 Wechselwirkung wurde durch SPR-Messungen bestimmt. Hierzu wurde zuerst GST-versehenes C-RAF auf einen mit GST-Antikörpern beschichteten Biosensor-Chip immobilisiert (ca. 300 Reportereinheiten). Als nächstes wurde 14-3-3ζ (1 μM) in Abwesenheit und Anwesenheit von **60** (0.1 mM und 1 mM) injiziert (modifiziert nach <sup>[128]</sup>).

Die mit dem molekularen Fragment **60** erhaltenen Ergebnisse belegen somit, dass Fusicoccin A-Fragmente als Ausgangsstrukturen zur Entwicklung von Stabilisatoren der 14-3-3/C-RAF-Interaktion Verwendung finden können. Ein weiterer Ausbau dieses Ansatzes (in Richtung Entwicklung potenterer Stabilisatoren) könnte somit die Möglichkeit eröffnen, neue therapeutische Wirkstoffe zur Behandlung von Krankheiten, welche auf einem überaktivierten Ras-RAF-MAPK-Signalweg basieren, zu entwickeln (Abb. 64) <sup>[128]</sup>.



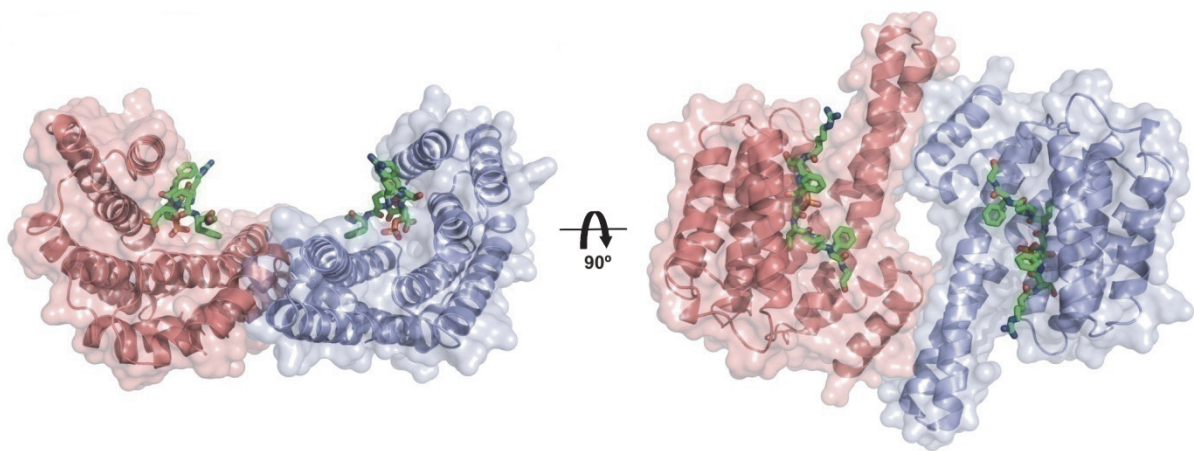


**Abb. 64:** Mögliches Modell der chemotherapeutischen Modulation des Ras-RAF-MEK-ERK-Signalweges durch synthetische, kleine Fragmente, welche den inhibierenden RAF/14-3-3 Komplex stabilisieren. **(A)** In nicht-stimulierten Zellen ist RAF von 14-3-3 Proteinen in einer inaktiven Konformation gebunden. Nach einer Dephosphorylierung von zwei Serineinheiten (Ser<sup>233</sup> und Ser<sup>259</sup> in C-RAF) wird die RAF/14-3-3-Interaktion abgeschwächt und aktiviertes Ras kann RAF an die Plasmamembran rekrutieren. An der Plasmamembran wird RAF somit aktiviert und phosphoryliert MEK. Eine aktivierende Phosphorylierung von ERK durch MEK führt zur Expression von Genen, die Krebszellenwachstum, Metastasenbildung und Angiogenese in Krebs fördern. **(B)** Die Überaktivierung des Ras-RAF-MEK-ERK-Signalweges, welche in vielen Krebszellen und in Wachstumskrankheiten wie dem Noonan oder LEOPARD-Syndrom auftreten, können durch Fragmente stabilisiert werden, welche den inhibierenden RAF/14-3-3-Komplex stabilisieren und dadurch die Anheftung des RAF durch aktiviertes Ras verhindern (modifiziert nach <sup>[128]</sup>).

## Ergebnisse und Diskussionen

### 3.5 Synthese von 14-3-3 - MLF1-stabilisierenden Fragmenten

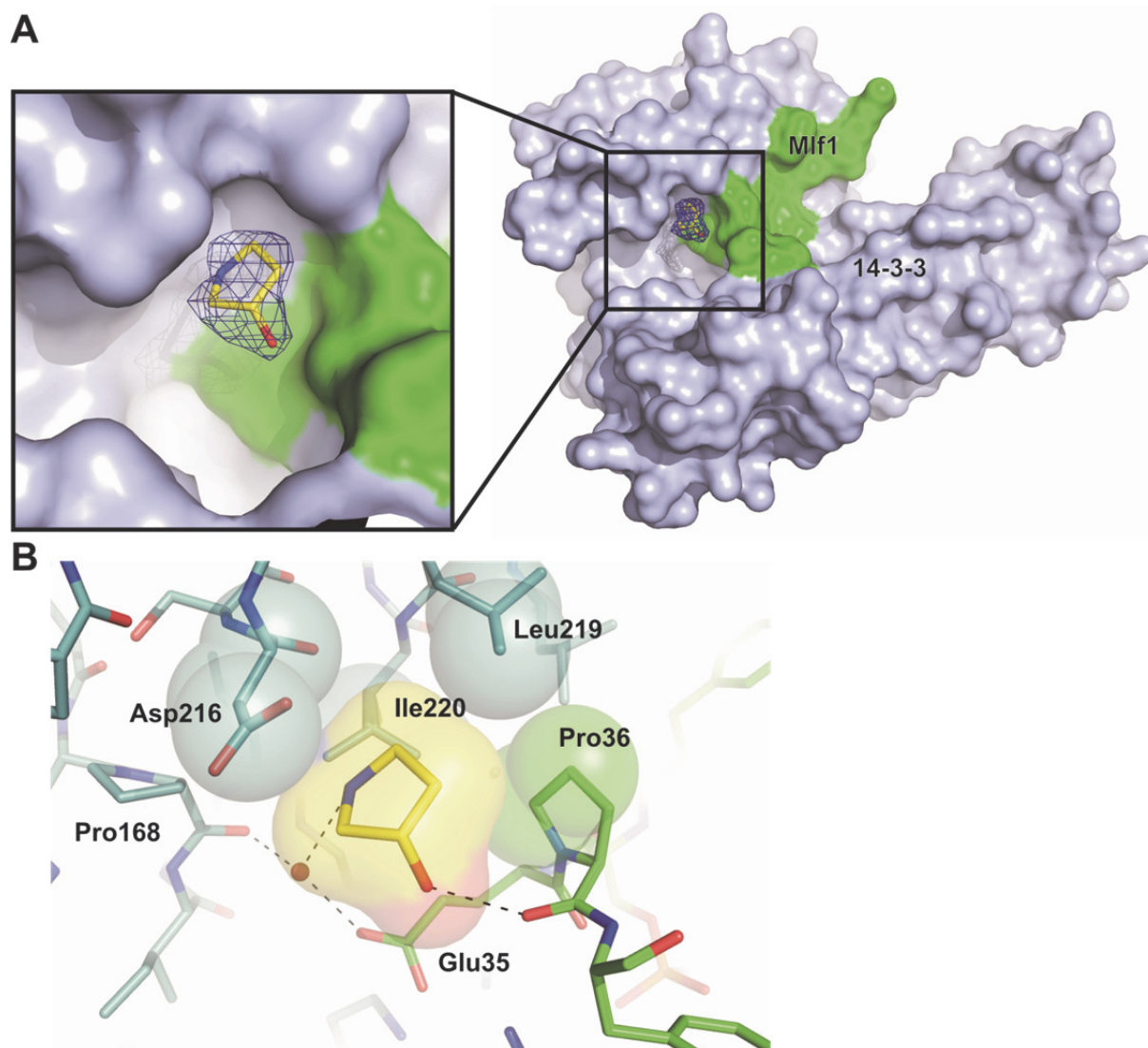
Der Myeloid Leukämie Faktor 1 (MLF1) ist ein Protein, welches in die Entstehung der akuten Myeloid-Leukämie und des Myelodysplastischen Syndroms (MDS) involviert ist. Bei diesen Erkrankungen entsteht durch Mutationen ein Fusionsprotein mit Nucleophosmin (NPM), einem nuklearen Phosphoprotein, wodurch die Transformationsaktivität von MLF1 als ein möglicher Transkriptions-Coaktivator durch Wechselwirkungen mit nuklearen Proteinpartnern gefördert wird <sup>[133-135]</sup>. MLF1 ist überexprimiert in akuter Myeloid-Leukämie, verbunden mit der positiven Beeinflussung eines malignen Phenotyps <sup>[136]</sup>. Weitere Studien zeigen, dass MLF1 ebenso im Lungen-Plattenepithelkarzinom und auch im Ösophagealkrebs involviert ist <sup>[137-138]</sup>. Mögliche Proteinkinasen, welche in der Phosphorylierung von MLF1 involviert sind, sind z.B. die Proteinkinase A, Protein-Kinase C oder die Calcium/Calmodulin-abhängige Kinase <sup>[139]</sup>. Leider ist das Wissen über die physiologische Rolle von MLF1 bisher noch sehr limitiert und beschränkt sich hauptsächlich auf die Auffindung von MLF1-Interaktionspartnern. Dabei wurden z.B. 14-3-3 Proteine gefunden <sup>[140-141]</sup>. Da 14-3-3 Proteine, wie im Kapitel 3.4 gezeigt, in der Lage sind, die Funktion von Proteinen durch eine Bindung zu regulieren <sup>[128]</sup>, wurde in der Arbeitsgruppe Ottmann eine Kristallstruktur eines Komplexes von menschlichem 14-3-3 $\epsilon$  mit dem entsprechenden MLF1-Interaktionsmotiv angefertigt. Der 14-3-3 Dimer zeigt dabei die charakteristische W-ähnliche Form, in der jedes Monomer eine ligandenbindende Tasche besitzt, in welche das MLF1-Peptid bindet (Abb. 65) <sup>[142]</sup>.



**Abb. 65:** Kristallstruktur des 14-3-3 $\epsilon$  Dimers im Komplex mit einem MLF1(29-42)pSer34-Modellpeptid. Jedes 14-3-3 Monomer (blau und rot) beherbergt ein MLF1(29-42)pSer34 Phosphopeptid (grün) <sup>[142]</sup>.

## Ergebnisse und Diskussionen

Anschließend wurde von der Arbeitsgruppe Ottmann nach niedermolekularen Fragmenten gesucht, welche an solche 14-3-3/MLF1-Komplexe binden. Dabei konnte aus einer aus 96 Molekülen bestehenden Fragmentbibliothek eine Verbindung, 3-Pyrrolidinol (**78**), als ein möglicher Kandidat zur Stabilisierung der 14-3-3/ MLF1-Phosphopeptid-Interaktion aufgefunden werden (Abb. 66) <sup>[142]</sup>.

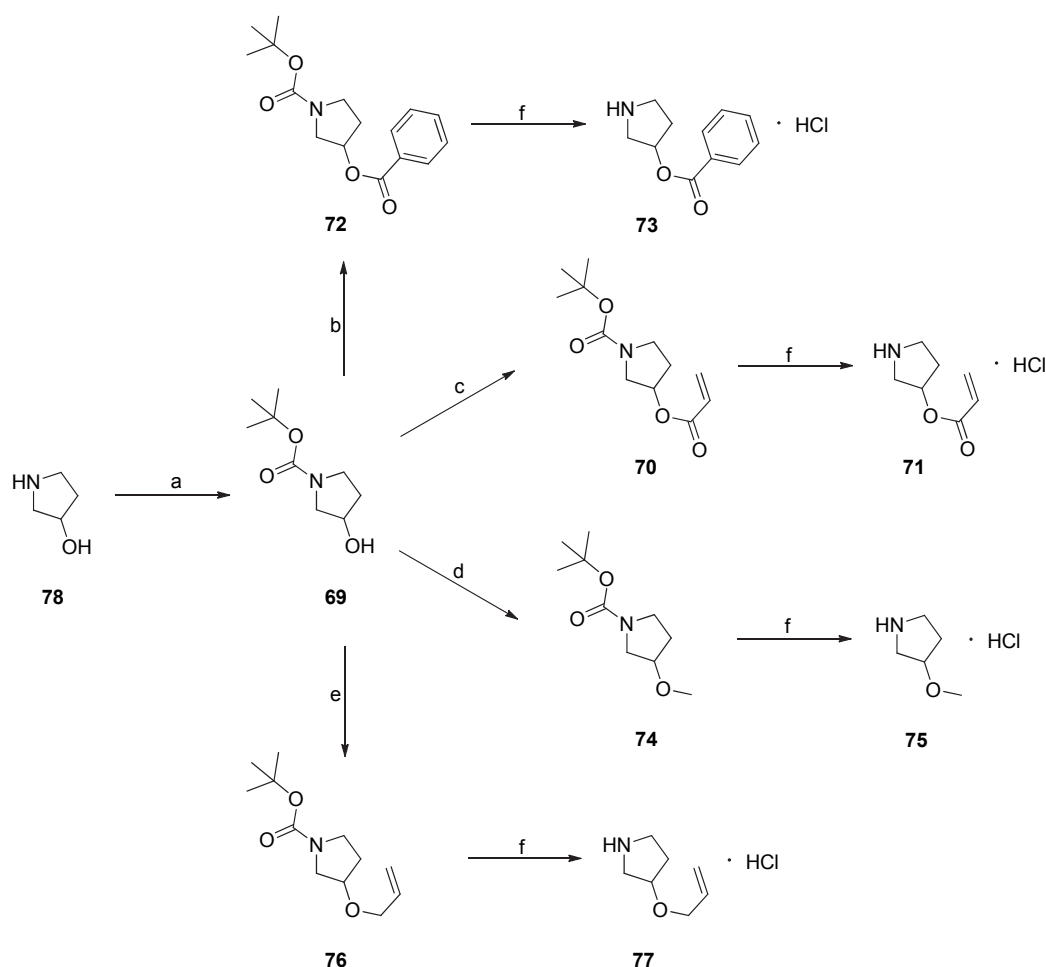


**Abb. 66:** Bindung von 3-Pyrrolidinol (**78**) an den 14-3-3 $\epsilon$ /MLF1(29-42)pSer-Komplex. **(A)** Kristallstruktur von **78** (gelb), welches im 14-3-3 $\epsilon$  (grau) und MLF1(29-42)pSer (grün) Komplex gebunden ist. **(B)** **78** (gelb) ist über ein Wasserstoffbrückennetzwerk an 14-3-3 $\epsilon$  (blau) und MLF1(29-42)pSer (grün) gebunden <sup>[142]</sup>.

## Ergebnisse und Diskussionen

3-Pyrrolidinol (**78**) belegt dabei nur einen kleinen Teil der Bindungstasche, welche durch die Bindung von 14-3-3 $\epsilon$  und dem MLF1-Phosphopeptid entsteht. Dabei bilden sich Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Pyrrolidinol und den beiden Proteinen aus, wodurch die Protein-Protein-Wechselwirkung gestärkt wird.

Deshalb sollte in einem nächsten Schritt eine kleine Bibliothek an Pyrrolidinolderivaten synthetisiert werden (Abb. 67), um somit eventuell potentere und spezifischere Moleküle zur Stabilisierung der Protein-Protein-Wechselwirkung aufzufinden.



**Abb. 67:** Synthesestrategie zur Darstellung der potentiellen MLF1/14-3-3 Stabilisatoren **69** – **77**, die auf dem 3-Pyrrolidinol (**78**)-Gerüst basieren. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a)  $\text{Boc}_2\text{O}$ , TEA, DCM, 12 h, 0 °C bis RT (87 %); (b) Benzoylchlorid, DIPEA, DCM, 0 °C, 4 h (51 %), (c) Acryloylchlorid, DIPEA, DCM, 0 °C, 4 h (98 %); (d) NaH, MeI, THF, 12 h, RT (61 %); (e) NaH, Allylbromid, THF, 0 °C bis RT, 12 h (98 %); (f) 4M HCl/Dioxan, 1 h, RT (>98 % (**71**, **73**, **75**, **77**)).

## Ergebnisse und Diskussionen

---

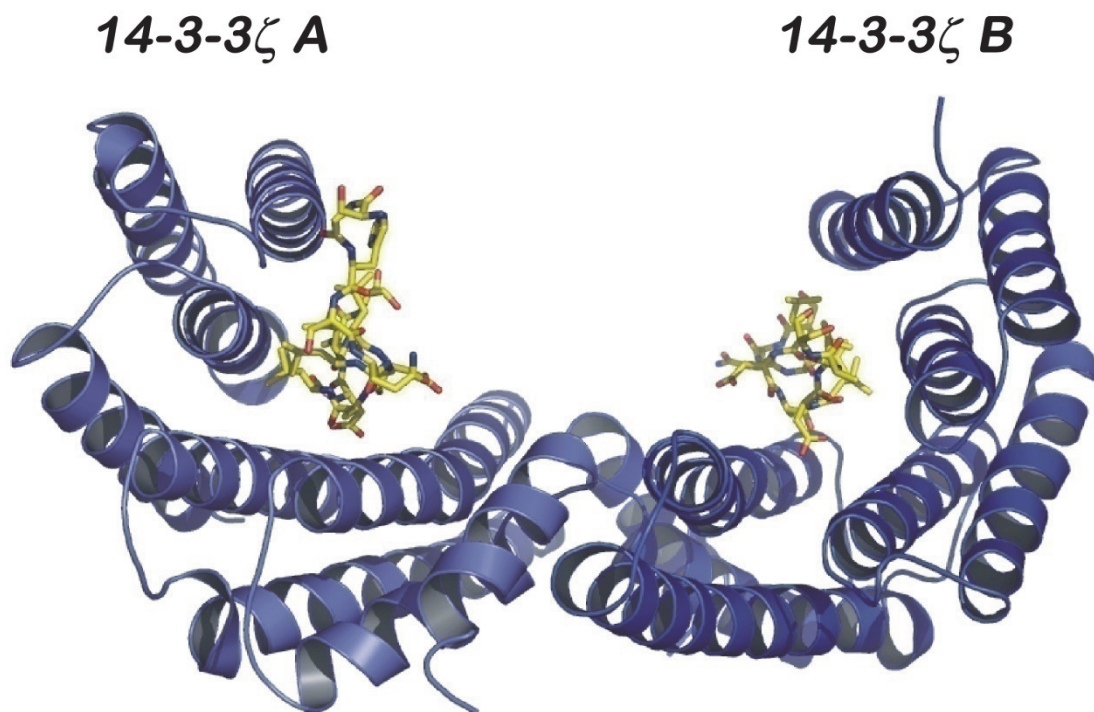
Zur Darstellung dieser Derivate wurde 3-Pyrrolidinol (**78**) in einem ersten Schritt analog der Vorschrift von Bhat et. Al. <sup>[143]</sup> mit Boc<sub>2</sub>O umgesetzt, um somit das Amin für die späteren Reaktionen am freien Alkohol zu schützen und eventuelle Nebenreaktionen am Amin zu vermeiden. Das so synthetisierte N-Boc-3-pyrrolidinol (**69**) wurde anschließend in verschiedenen Ansätzen an der freien Alkoholgruppe modifiziert, da die Analyse der Kristallstruktur von **69** im 14-3-3/MFK1 Komplex eine mögliche Bindungsgrube an dieser Stelle andeutete. Deshalb wurde **69** mit den Säurechloriden Acryloylchlorid zum Ester **70** sowie mit Benzoylchlorid zum Ester **72** in nahezu quantitativen Ausbeuten umgesetzt. Neben den beiden dargestellten Estern wurden auch zwei Ether generiert, indem N-Boc-3-pyrrolidinol (**69**) mit Methyljodid zum entsprechenden Methylether **74** als auch mit Allylbromid zum entsprechenden Allylether **76** umgesetzt wurde. Zuletzt wurden die Boc-Gruppen der vier Verbindungen **70**, **72**, **74** und **76** mit 4M HCl in Dioxan quantitativ entfernt und nach der Aufarbeitung die entsprechenden HCl-Salze **71**, **73**, **75** und **77** erhalten. Neben den entschützten Produkten **71**, **73**, **75** und **77** wurden auch die noch Boc-versehenen Moleküle **69**, **70**, **72**, **74** und **76** durch Manuela Molzan in der Arbeitsgruppe von Dr. Christian Ottmann am Chemical Genomics Center der Max-Planck-Gesellschaft, Dortmund, auf einen stabilisierenden Effekt im 14-3-3ε/MLF1 Komplex getestet. Da in den durchgeführten SPR-Messungen allerdings kein stabilisierender Effekt der synthetisierten Moleküle **69** - **77** nachgewiesen werden konnte, wurde dieser Ansatz zur Darstellung von niedermolekularen 14-3-3-Modulatoren nicht weiterverfolgt.



## Ergebnisse und Diskussionen

### 3.6 Synthese von kovalenten, zellgängigen 14-3-3 Inhibitoren

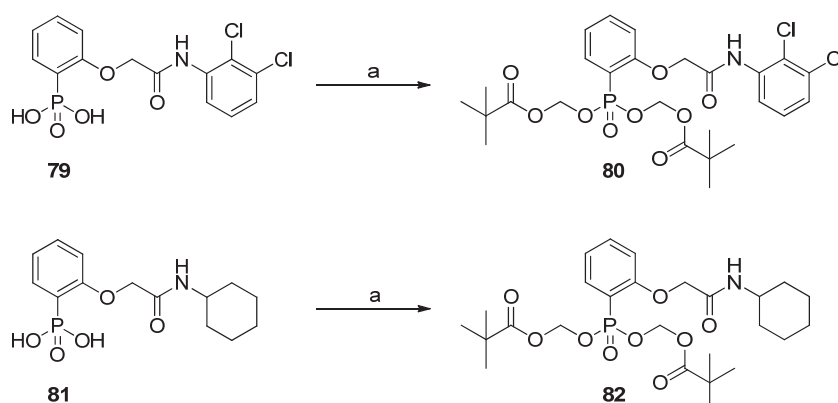
Auch Inhibitoren von 14-3-3-vermittelten Protein-Protein-Interaktionen können chemotherapeutisch-nutzbare Effekte hervorrufen. Dies wurde in der Arbeitsgruppe von Christian Ottmann am Beispiel der 14-3-3-Exoenzym S-Interaktion untersucht. Das Exoenzym S (ExoS)- Cytotoxin wird durch ein Typ III-Sekretionssystem des Gram-negativen Bakteriums *Pseudomonas aeruginosa* sekretiert. *Pseudomonas aeruginosa*-Infektionen treten gehäuft bei immunsupprimierten Individuen auf, so z. B. bei der Mukoviszidose, Krebs oder dem Wundbrand, wo sie teils tödlich verlaufende Infektionen hervorrufen. Das bifunktionale Toxin ExoS übernimmt dabei eine Schlüsselrolle. Dieses ist ein bifunktionales Protein, welches N-terminal über eine Rho-GTPase Aktivierungsaktivität und C-terminal über eine ADP-Ribosyltransferasenaktivität verfügt; eine Aktivierung der letzteren führt dabei zum Zelltod. Die intrazelluläre Funktion von ExoS hängt dabei von einer Interaktion mit 14-3-3 Proteinen ab. So ist eine phosphorylierungsunabhängige Interaktion von ExoS mit 14-3-3-Proteinen essentiell für die ADP-Ribosylierungsaktivität (Abb. 72) [144].



**Abb. 68:** Struktur von 14-3-3 (blau) im Komplex mit ExoS-Modellpeptiden (in gelb) [144].

## Ergebnisse und Diskussionen

Zur Entwicklung möglicher 14-3-3-Inhibitoren wurden deshalb in der AG Ottmann in einem virtuellen Screening nach 14-3-3 Inhibitoren der 14-3-3/ExoS Protein-Protein-Wechselwirkung gesucht. Hierzu wurden aus anfänglich über 8.000.000 Verbindungen durch verschiedene Voraussetzungen und Auswahlverfahren wie u.a. einem Phosphonat-Unterstrukturfilter, der Anwendung von Lipinski's Regel und eines HTS (*high-throughput screening*)-Filters 14 Phosphatinhibitor-Kandidaten, welche alle auf einem (2-(2-Amino-2-oxoethoxy)phenyl)phosphosäure-Grundgerüst aufbauen, aufgefunden. In einem biochemischen Test konnte die Wirksamkeit der gefundenen Kandidaten bestätigt werden. Um jedoch in einem biologischen Assay die Wirksamkeit der Verbindungen besser studieren zu können, war eine Darstellung von zellgängigen Derivaten nötig. Deshalb sollten zwei aktive Phosphonate in zellgängige Phosphonatester überführt werden und anschließend auf ihre Wirksamkeit in Zellmodellen getestet werden (Abb. 69).



**Abb. 69:** Synthesestrategie zur Darstellung der Phosphonatester **80** und **82**, ausgehend von den gefundenen PPI-Inhibitoren **79** und **81**. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) Chloromethylpivalat, TEA, DMF, 60 °C, 12 h (48 % (**80**), 47 % (**82**)).

Die Synthese der entsprechenden Phosphonatester wurde analog der Vorschriften von Ortmann et. Al. und Wiesner et. Al. <sup>[145-146]</sup> durchgeführt. Dazu wurden die Phosphorsäuren **79** und **81** bei 60 °C über Nacht mit Chloromethylpivalat umgesetzt und die Reaktionsprodukte anschließend über C18-Silica analysenrein isoliert. Eine biologische Analyse der Aktivität der dargestellten Verbindungen konnte im Rahmen dieser Dissertation bisher leider noch nicht durchgeführt werden, so dass weitere Ergebnisse noch ausstehen.

### 4. Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde eine neuartige Totalsynthese des makrozyklischen Lactons (-)-A26771B (**1**) entwickelt, welche sich von den bislang veröffentlichten Synthesemethoden deutlich unterscheidet. Während vorherige Arbeiten meistens auf einer Ringbildung durch Macrolactonisierung setzten, basierte die Bildung des 16-gliedrigen Makrolids in dieser Arbeit auf einer Ringschluss-Metathese-Reaktion. Die Gesamtausbeute der Totalsynthese belief sich dabei auf 8.6 %.

Anschließend sollte aus dem Naturstoff eine chemische Sonde zur Targetbestimmung entwickelt werden. In einem ersten Versuch sollte hierzu eine Modifikation des Naturstoffes an der Säurefunktion der Seitenkette durchgeführt werden. Zwar gelang die chemische Darstellung dieses Derivates, der anschließende Pulldown führte jedoch zu keinem Erfolg; dies könnte unter anderem an der Esterbindung zwischen dem Bernsteinsäurerest (an welchem die Reportereinheit angebracht wurde) und dem eigentlich Makrolidring liegen, welche prinzipiell einer enzymatischen Spaltung unterliegen kann und somit eventuell eine Detektion der gebundenen Sonde an ihre Targets verhindern kann.

Deshalb wurde in einem zweiten Versuch eine modifizierte Sonde des Naturstoffes dargestellt, in welcher an der (C15)-Position eine Azid-Einheit (als minimaler Reporter) in das Molekül eingebracht wurde. Diese Position wurde gewählt, da einerseits aufgrund des Reaktionsweges eine entsprechende Modifikation an dieser Stelle möglich war, andererseits das Derivat noch große strukturelle Ähnlichkeiten mit dem eigentlichen Naturstoff aufweist. Dabei erlaubt eine Azid-Modifikation, eine Targetidentifizierung über einen sogenannten 2-Schritt-Pulldown-Ansatz, in welchem der Naturstoff zuerst mit dem Proteom inkubiert und in einem zweiten Schritt mittels einer Cu(I)-katalysierten Azid-Alkin-Cycloaddition modifiziert wird (z.B. mit Biotinalkin zur Durchführung einer Affinitätsaufreinigung der Targets mit Streptavidin). Trotz intensiver Bemühungen konnten auf diesem Wege bisher jedoch noch keine Targets des Naturstoffes aufgefunden werden. Ein Grund hierfür könnte sein, dass die eingebrachte Azidgruppe aufgrund ihres sterisch-anspruchsvollen Umfeldes für eine Klick-Reaktion nicht ausreichend reaktiv ist. Diese bisherigen Befunde deuten daher an, dass weitere Derivate, in welchen z. B. die Azidgruppe über einen längeren Linker an den Naturstoff angebracht wurde, zur Targetidentifizierung benötigt werden, welche jedoch eine größere Änderung der etablierten Synthesestrategie erfordern. Alternativ könnten auch Derivate, in welchen die reverse bioorthogonale



## Zusammenfassung und Ausblick

---

Einheit der Klick-Reaktion, ein Alkin, dargestellt werden, synthetisiert werden, da Alkin-basierte chemische Sonden im Allgemeinen in 2-Schritt-Pulldown-Experimenten (in der AG Kaiser) einen geringeren Hintergrund und somit leichter identifizierbare Targets aufwiesen als Azid-modifizierte Substanzen. Aufgrund der Zeitbeschränkung konnten jedoch diese zusätzlichen Synthesen im Rahmen der Dissertation nicht mehr durchgeführt werden.

Weiterhin sollte untersucht werden, ob die für den Naturstoff (-)-A26771B entwickelte Syntheseroute auf die strukturell ähnlichen, jedoch nur 12-gliedrigen Makroliden Cladospolide B - D, übertragen werden kann. Leider zeigten diese Studien jedoch, dass eine direkte Adaptierung dieser Syntheseroute für (-)-A26771B (**1**) nicht möglich ist. So gelang zwar die Darstellung der linearen Fragmente aller drei Isomere in guten Ausbeuten (und somit analog zur Synthese von (-)-A26771B (**1**)), aufgrund der deutlich größeren Ringspannung konnten die jeweiligen, linearen Fragmente jedoch nicht über eine ringschließende Metathese zu einem Makrozyklus geschlossen werden. Auch verschiedene Strategien, die Rotationsfreiheit der linearen Fragmente der Cladospolide durch Derivatisierung wie z. B. einer Abspaltung der Ketal-Schutzgruppe an der (C4) und (C5) Position oder durch eine Dehalogenierung des Chlors an der (C12) Position zu erhöhen, führten nicht zur Bildung des Makrolids unter den Bedingungen der ringschließenden Metathese.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten niedermolekulare Stabilisatoren der 14-3-3-Proteinwechselwirkungen dargestellt werden. Als erste Aufgabenstellung sollten hierzu rational-entworfene Fragmente des Naturstoffes Fusicoccin A dargestellt werden, welche die Wechselwirkung von 14-3-3-Proteinen mit dem Bindungspartner C-RAF stabilisieren sollten. Da der Bindungsmodus dieses Naturstoffes an 14-3-3-Proteine und entsprechenden Bindungsproteinen in Vorarbeiten durch Röntgenkristallstrukturanalyse bereits aufgeklärt werden konnte, zeigte eine Analyse, dass Derivate des A-Ringes mögliche Fragmentstabilisatoren darstellen könnten und wurden deshalb als Synthesetargets definiert. Zwar gelang die Synthese dieser Fragmente, leider zeigten viele dieser jedoch keine ausreichende stabilisierende Aktivität. Nur für die Derivate **57** und **65** und interessanterweise für ein Syntheseintermediat, 6-Methoxy-5-oxohexanal (**60**), welches nur geringe strukturelle Ähnlichkeiten zu Fusicoccin A zeigt, konnte eine Bindung nachgewiesen werden. In weiteren biochemischen Studien zeigte sich dann, dass **60** bei einer Konzentration

## Zusammenfassung und Ausblick

---

von 100  $\mu$ M in der Tat einen stabilisierenden Effekt auf die Bindung zwischen 14-3-3 und dem C-RAF-Modellpeptid hervorrief. Durch Röntgenstrukturanalysen von **60** mit einem binären 14-3-3/QRSTpSTPNVH-COOH-Komplex (einem Modellpeptid, welches der 14-3-3-Bindungsdomäne von C-RAF entspricht) konnte nicht nur die Bindung an den Komplex nachgewiesen werden, sondern auch aufgezeigt werden, dass **60** trotz der nur geringen strukturellen Ähnlichkeit die Fusicoccin A-Bindestelle aus dem ternären Fusicoccin A/14-3-3/PMA2-Komplex belegt. Somit kann die niedermolekulare Verbindung **60** tatsächlich als Ausgangspunkt zur Entwicklung potenter 14-3-3-Protein-Interaktions-Stabilisatoren dienen, welche z.B. Ras-RAF-MAPK mit einem therapeutischen Nutzen modulieren.

In einem weiteren Ansatz sollte dann ein Derivat eines von der Arbeitsgruppe Yao-entwickelten Inhibitors (**47**) von 14-3-3 Protein-Protein Wechselwirkungen dargestellt werden. Dieser Peptidwirkstoff sollte so modifiziert werden, dass er an seinem N-terminalen Ende eine bioreaktive 2-Phenyloxiran-Einheit trägt, so dass er potentiell nach Bindung in die 14-3-3 Liganden-Bindungstasche eine kovalente und somit irreversible Bindung mit dem Protein eingehen kann. Die Synthese dieses rational-entworfenen Derivates **40** konnte erfolgreich durchgeführt werden; da die Ergebnisse der biologischen Studien jedoch zurzeit noch ausstehen, lässt sich bisher noch keine Aussage über die Effektivität des potentiellen Inhibitors **40** auf eine irreversible Inhibierung von 14-3-3 Proteinen treffen.

Des Weiteren wurden zellgängige Prodrug-Derivate von Phosphonatsäurederivaten, die in einem virtuellen Hochdurchsatzscreening nach Inhibitoren der 14-3-3/ExoS Protein-Protein Wechselwirkung aufgefunden wurden, dargestellt. Die Synthese der entsprechenden Phosphorsäuren-Ester-Inhibitoren konnte erfolgreich abgeschlossen werden, die notwendigen biologischen Experimente zur Evaluierung ihrer Zellgängigkeit und Prodrug-Eigenschaften stehen jedoch bisher noch aus.

In einem letzten Teilprojekt wurde dann eine fokussierte Bibliothek von 3-Pyrrolidinol (**78**)-Derivaten dargestellt. 3-Pyrrolidinol konnte in Vorarbeiten als Stabilisator der 14-3-3/MLF1-Protein-Protein-Interaktion aufgefunden werden. Solche Stabilisatoren könnten interessante Chemotherapeutika für durch freies MLF-1 induzierte Krankheiten wie z.B. die Myeloid-Leukämie oder das Myelodysplastische Syndrom darstellen. Trotz der erfolgreichen Synthesen mehrerer 3-Pyrrolidinol-Derivaten konnte leider keine potentere Verbindung als die Ausgangsverbindung

## **Zusammenfassung und Ausblick**

---

3-Pyrroldidinol (**78**) gefunden werden. Diese Befunde deuten darauf hin, dass zu einer effizienteren Stabilisierung vermutlich größere Fragmente notwendig werden.

### 5. Experimenteller Teil

#### 5.1 Allgemeine Arbeitstechniken

##### 5.1.1 Chemikalien

Es kamen Chemikalien von den Firmen Sigma/Aldrich, Fluka, Merck, Acros, Riedel-de-Haën, Iris, Roth und Fischer Scientific zum Einsatz und wurden ohne weitere Aufreinigung verwendet. Trockene Lösungsmittel in der bestmöglichen Qualität wurden von denselben Firmen bezogen.

##### 5.1.2 Dünnschichtchromatographie (TLC)

Die Dünnschicht-chromatographischen Analysen wurden auf DC-Alufolien, Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, der Firma Merck durchgeführt. Die Substanzen wurden durch UV-Licht ( $\lambda = 254$  nm) oder durch Anfärben mit den unten genannten Reagenzien A und B und anschließendem Erwärmen nachgewiesen. Die jeweiligen Laufmittel und R<sub>f</sub>-Werte sind in den Arbeitsvorschriften angegeben.

Reagenz A: 20 g Molybdätdi-phosphorsäure in 80 mL Ethanol.

Reagenz B: 1.5 g KMnO<sub>4</sub>, 10 g K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> und 1.25 mL einer 10% wässrigen NaOH in 200 mL Wasser.

##### 5.1.3 Säulenchromatographie

Säulenchromatographische Reinigungen wurden in Glassäulen mit Kieselgel der Firma Acros Organics (0.035-0.070 mm, 60 Å) durchgeführt. *Reversed-Phase* Chromatographien wurden mit LiChroprep RP-18 (0.040-0.063 mm) der Firma Merck durchgeführt.

#### 5.2 Analytische Verfahren

##### 5.2.1 NMR-Spektroskopie

<sup>1</sup>H-NMR-Spektren wurden an einem Spektrometer Varian Mercury 400 (400 MHz für <sup>1</sup>H- und 101 MHz für <sup>13</sup>C-NMR), einem Bruker Avance DRX 500 (500 MHz für <sup>1</sup>H- und 126 MHz für <sup>13</sup>C-NMR), einem Varian Unity Inova 600 (600 MHz für <sup>1</sup>H- und 151 MHz für <sup>13</sup>C-NMR) oder einem Bruker Avance II 700 (700 MHz für <sup>1</sup>H- und 176 MHz für <sup>13</sup>C-NMR) aufgenommen. Die <sup>1</sup>H-NMR Spektren sind wie folgt

## Experimenteller Teil

---

angegeben: Die chemischen Shifts ( $\delta$ ) in ppm bezogen auf die Referenz des charakteristischen Signals des undeuterten Lösungsmittels, die Multiplizität (s, *singlet*; d, *doublet*; t, *triplet*; dd, *doublet of doublet*; dt, *doublet of triplet*; td, *triplet of doublet*; m, *multiplet*; b, *broad signal*), die Kupplungskonstante (J) in Hertz (Hz) und die Anzahl der Protonen (H).

### 5.2.2 Hochleistungsflüssigchromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS)

LC-MS-Proben wurden auf Agilent Technologies 1200 Series-HPLC der Firma Agilent vermessen. Als Trennsäule diente eine Eclipse XDB-C18-Säule, 5  $\mu$ m, der Firma Agilent. Als Massenspektrometer diente der Finnigan LCQ Advantage Max von Thermo Electron Corporation. Dabei wurde ein linearer Gradient von Lösungsmittel B (0.1 % Ameisensäure in Acetonitril) in Lösungsmittel A (0.1 % Ameisensäure in Wasser) bei einer Flussrate von 1 mL/min benutzt. Gradient C<sub>18</sub>: 0 min (10 % B) → 1 min (10 % B) → 10 min (100 % B) → 12 min (100 % B) → 15 min (10 % B).

Alternativ wurde ein Agilent 1100 Series HPLC-System von Hewlett-Packard mit einer CC 250/4 Nucleosil 120-5 C4 Säule von Macherey-Nagel verwendet, welches an ein Thermo Finnigan LCQ Advantage Max ESI-Spektrometer angeschlossen war. Auch hierbei wurde ein linearer Gradient von Lösungsmittel B (0.1 % Ameisensäure in Acetonitril) in Lösungsmittel A (0.1 % Ameisensäure in Wasser) bei einer Flussrate von 1 mL/min benutzt. Gradient C<sub>4</sub>: 0 min (10 % B) → 1 min (10 % B) → 10 min (100 % B) → 12 min (100 % B) → 15 min (10 % B).

### 5.2.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die HPLC-Aufreinigungen der synthetisierten Verbindungen erfolgte mit einem Varian HPLC-System (Pro Star 215) der Firma Varian. Als Trennsäule diente hierbei eine Nucleodor C18 Gravity, 5 $\mu$ m, der Firma Macherey-Nagel. Produktdetektion erfolgte bei 210 nm. Als Laufmittel wurde ein linearer Gradient aus Lösungsmittel B (0.1 % TFA in Acetonitril) in Lösungsmittel A (0.1 % TFA in Wasser) bei einer Flussrate von 25 mL/min verwendet.

### 5.2.4 Hochauflösende Massenspektrometrie (HRMS)

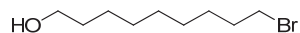
HRMS Messungen wurden an einem TRACE GC Ultra DFS (GC/EI)-System von Thermo Scientific durchgeführt. Alternativ wurde ein Accela/LTQ Orbitrap (LC/ESI)-System von Thermo Scientific verwendet.

## Experimenteller Teil

### 5.3 Präparative Vorschriften

#### 5.3.1 Synthese der Makroliden und deren Derivaten

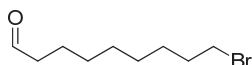
##### 9-Bromononan-1-ol (**84**)



1,9-Nonandiol (**2**, 5.00 g, 31.20 mmol) wurde in Toluol (92 mL) gelöst, HBr (9M, 48%, 5.6 mL) wurde hinzugefügt und die Lösung bei 130°C für 72 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die wässrige Phase abgetrennt und die organische Phase mit Ether (200 mL) verdünnt. Anschließendes Waschen der organischen Phase mit 1M NaOH (75 mL), gesättigter NaCl-Lösung (75 mL) und 0.5 M Phosphatpuffer (pH 7, 75 mL), Trocknen der organischen Phase über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum und Aufreinigung mittels Säulenchromatographie (10 % Ethylacetat in Cyclohexan) führte zu 9-Bromononan-1-ol (**84**, 6.76 g, 30.3 mmol, 97%) als beigefarbenen, kristallinen Feststoff.

TLC (10 % Ethylacetat in Cyclohexan): R<sub>f</sub> = 0.48. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 3.64 (t, J = 6.3 Hz, 2H), 3.40 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 1.85 (m, 2H), 1.57 (m, 2H), 1.44 (m, 2H), 1.31 (s, 8H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 63.1, 34.1, 32.8, 32.8, 29.4, 29.3, 28.7, 28.1, 25.7.

##### 9-Bromononanal (**85**)

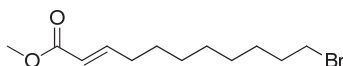


9-Bromononan-1-ol (**84**, 1.0 eq, 6.16 g, 27.6 mmol) gelöst in trockenem DCM (15 mL) wurde zu einer gerührten Lösung von Pyridinium-Chlorochromat (1.5 eq, 41.4 mmol, 8.66 g) und Celite (8.66 g) in trockenem DCM (200 mL) gegeben. Nach 3 Stunden Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktionsmischung durch Zugabe von Ether (250 mL) verdünnt, über Celite abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (33 % Ethylacetat in Cyclohexan) wurde dann 9-Bromononanal (**85**, 5.90 g, 26.7 mmol, 97 %) als schwach gelbes Öl erhalten.

## Experimenteller Teil

TLC (33% Ethylacetat in Cyclohexan):  $R_f = 0.76$ .  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  9.76 (t,  $J = 1.8$  Hz, 1H), 3.40 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 2.43 (td,  $J = 7.3, 1.8$  Hz, 2H), 1.90 - 1.79 (m, 2H), 1.69 - 1.57 (m, 2H), 1.43 (d,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 1.32 (s, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  202.9, 43.9, 34.0, 32.7, 29.2, 29.0, 28.5, 28.1, 22.0.

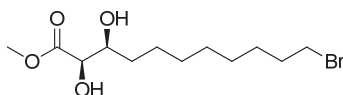
### (*E*)-Methyl-11-bromoundec-2-enoat (**10**)



9-Bromononanal (**85**, 1.0 eq, 2.79 g, 12.6 mmol) wurde in DCM (60 mL) gelöst und mit (Methoxycarbonylmethylen)-triphenylphosphoran (1.2 eq, 5.06 g, 15.1 mmol) versetzt. Nach dem Rühren über Nacht bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Eine säulenchromatographische Aufreinigung (10 % Ethylacetat in Cyclohexan) lieferte (*E*)-Methyl-11-bromoundec-2-enoat (**10**, 3.37 g, 12.2 mmol, 97 %) als klares, gelbes Öl.

TLC (10 % Ethylacetat in Cyclohexan):  $R_f = 0.58$ .  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.96 (dt,  $J = 15.6, 7.0$  Hz, 1H), 5.81 (dt,  $J = 15.6, 1.6$  Hz, 1H), 3.72 (s, 3H), 3.40 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 2.19 (qd,  $J = 7.2, 1.5$  Hz, 2H), 1.89 – 1.81 (m, 2H), 1.47 – 1.39 (m, 4H), 1.30 (s, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  167.2, 149.7, 120.8, 51.4, 34.0, 32.7, 32.2, 29.2, 29.0, 28.6, 28.1, 27.9.

### (2*R*,3*S*)-Methyl-11-bromo-2,3-dihydroxyundecanoat (**86**)



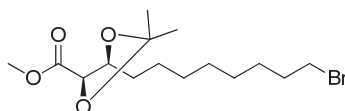
Eine Lösung von (*E*)-Methyl-11-bromoundec-2-enoat (**10**, 3.16 g, 11.1 mmol) und AD-Mix  $\alpha$  (15.5 g) in  $\text{H}_2\text{O}/t\text{BuOH}$  (1:1, 140 mL) wurde für 24 Stunden bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde langsam  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  (18 g) bei 0 °C hinzugefügt und die Reaktionsmischung unter Erwärmen auf Raumtemperatur für eine weitere Stunde gerührt. Die beiden Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase anschließend dreimal mit Ethylacetat (100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Eine

## Experimenteller Teil

säulenchromatographische Reinigung (2 % Methanol in DCM) lieferte dann (2*R*,3*S*)-Methyl-11-bromo-2,3-dihydroxyundecanoat (**86**, 3.16 g, 10.16 mmol, 92 %, *ee* = 85%) als beigefarbenen, kristallinen Feststoff.

TLC (2 % Methanol in DCM):  $R_f$  = 0.25.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  4.10 (s, 1H), 3.88 (t,  $J$  = 6.0 Hz, 1H), 3.83 (s, 3H), 3.40 (t,  $J$  = 6.9 Hz, 2H), 1.88 - 1.81 (m, 2H), 1.63 - 1.57 (m, 2H), 1.45 - 1.35 (m, 2H), 1.31 (s, 8H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  174.1, 73.0, 72.4, 52.9, 34.0, 33.7, 32.8, 29.3, 29.3, 28.6, 28.1, 25.6.

### (4*R*,5*S*)-Methyl-5-(8-bromooctyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolane-4-carboxylat (**11**)



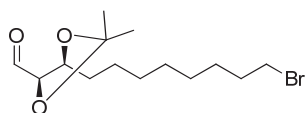
Eine Lösung aus (2*R*,3*S*)-Methyl-11-bromo-2,3-dihydroxyundecanoat (**86**, 1.0 eq, 3.28 g, 10.50 mmol), Aceton/2,2-Dimethoxypropan (1:1, 120 mL) und *p*-TsOH (0.05 eq, 0.52 mmol, 0.1 g) wurde für 60 Minuten bei 60 °C unter Argon gerührt. Nach dem Abkühlen wurde gesättigte  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung (60 mL) zugegeben, dreimal mit DCM (100 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach einer säulenchromatographischen Reinigung (10 % Ethylacetat in Cyclohexan) wurde dann (4*R*,5*S*)-Methyl-5-(8-bromooctyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolane-4-carboxylat (**11**, 3.60 g, 10.25 mmol, 98 %) als klares, schwach gelbes Öl erhalten.

TLC (10 % Ethylacetat in Cyclohexan):  $R_f$  = 0.43.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  4.11 (dd,  $J$  = 4.5, 2.8 Hz, 2H), 3.78 (s, 3H), 3.40 (t,  $J$  = 6.9 Hz, 2H), 1.89 – 1.81 (m, 2H), 1.79 – 1.70 (m, 1H), 1.69 – 1.59 (m, 1H), 1.45 (d,  $J$  = 10.4 Hz, 6H), 1.42 (s, 4H), 1.32 (s, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  171.1, 110.4, 78.8, 78.7, 52.0, 33.7, 33.1, 32.4, 29.0, 28.9, 28.3, 27.8, 26.8, 25.3, 25.3.



## Experimenteller Teil

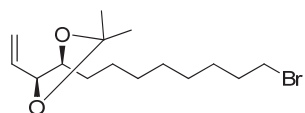
### (4*R*,5*S*)-5-(8-Bromooctyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolane-4-carbaldehyd (**87**)



Zu einer 0.1 M-Lösung von (4*R*,5*S*)-Methyl-5-(8-bromooctyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolane-4-carboxylat (**11**, 1.0 eq, 3.25 g, 9.24 mmol) in Toluol (100 mL) wurde bei -78 °C unter Argon DIBAL-H (2.5 eq, 1 M-Lösung, 23.1 mmol, 23.1 mL) über 3 Stunden langsam hinzuge tropft. Nach der Zugabe wurde für eine weitere Stunde bei dieser Temperatur gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch mit gesättigter Kalium-Natrium-Tartrat-Lösung (100 mL) gequenchet, die wässrige Phase dreimal mit DCM (100 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (17 % Ethylacetat in Cyclohexan) wurde dann (4*R*,5*S*)-5-(8-Bromooctyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolane-4-carbaldehyd (**87**, 2.36 g, 7.35 mmol, 80 %) als farbloses, klares Öl erhalten.

TLC (33 % Ethylacetat in Cyclohexan): *R*<sub>f</sub> = 0.50. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.72 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 4.03 (dt, *J* = 7.5, 6.1 Hz, 1H), 3.93 (dd, *J* = 7.6, 2.4 Hz, 1H), 3.40 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 1.89 – 1.80 (m, 2H), 1.71 – 1.64 (m, 2H), 1.46 (d, *J* = 10.4 Hz, 6H), 1.46 – 1.37 (m, 4H), 1.31 (s, 6H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 201.3, 111.0, 84.7, 60.4, 34.0, 32.8, 31.8, 29.6, 29.2, 28.6, 28.1, 27.3, 26.9, 26.0.

### (4*S*,5*S*)-4-(8-Bromooctyl)-2,2-dimethyl-5-vinyl-1,3-dioxolan (**6**)



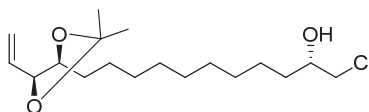
Zu einer Suspension von Methyltriphenylphosphoniumbromid (1.1 eq, 0.34 mmol, 125.9 mg) in trockenem THF (4 mL) wurde unter Argon bei -20 bis -25 °C n-BuLi (1.6 M in THF, 1.0 eq, 0.31 mmol, 194 µL) hinzugefügt. Die Reaktionsmischung wurde für weitere 30 Minuten bei dieser Temperatur gerührt, dann wurde die Lösung bei -20 bis -25 °C langsam zu einer Lösung von (4*R*,5*S*)-5-(8-bromooctyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolane-4-carbaldehyd (**87**, 1.0 eq, 0.31 mmol, 100 mg) in THF (4 mL) unter Argonatmosphäre gegeben. Die Lösung wurde unter Erwärmen auf

## Experimenteller Teil

Raumtemperatur für eine weitere Stunde gerührt, mit H<sub>2</sub>O (3 mL) gequencht und die wässrige Phase dreimal mit Ethylacetat (10 mL) extrahiert. Nach dem Trocknen der vereinigten organischen Phase über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wurde das Lösungsmittel entfernt und das Produkt säulenchromatographisch aufgereinigt (5 % Ethylacetat in Cyclohexan), so dass (4*S*,5*S*)-4-(8-Bromooctyl)-2,2-dimethyl-5-vinyl-1,3-dioxolan (**6**, 87.3 mg, 0.27 mmol, 88 %) als klares, gelbliches Öl erhalten wurde.

TLC (5 % Ethylacetat in Cyclohexan):  $R_f$  = 0.48. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  5.80 (ddd,  $J$  = 17.4, 10.3, 7.4 Hz, 1H), 5.39 – 5.32 (m, 1H), 5.24 (ddd,  $J$  = 10.3, 1.5, 0.8 Hz, 1H), 3.98 (dd,  $J$  = 8.3, 7.5 Hz, 1H), 3.70 – 3.63 (m, 1H), 3.40 (t,  $J$  = 6.9 Hz, 2H), 1.89 – 1.80 (m, 2H), 1.54 (dd,  $J$  = 7.6, 6.2 Hz, 2H), 1.41 (d,  $J$  = 3.8 Hz, 6H), 1.31 (s, 10H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  135.6, 118.7, 108.5, 82.8, 80.7, 34.0, 32.8, 31.8, 29.6, 29.2, 28.6, 28.1, 27.3, 26.9, 26.0.

### (*S*)-1-Chloro-11-((4*S*,5*S*)-2,2-dimethyl-5-vinyl-1,3-dioxolan-4-yl)undecan-2-ol (**7**)

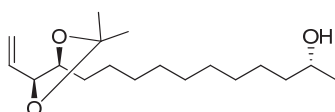


Zu einer (4*S*,5*S*)-4-(8-bromooctyl)-2,2-dimethyl-5-vinyl-1,3-dioxolan (**6**, 1.0 eq, 1.50 g, 4.70 mmol)-Lösung in THF (6 mL) wurde unter Argon langsam eine handwarme Rieke-Mg-Suspension (Suspension von 2.5 g in 100 mL THF, 3 eq, 14.1 mmol, 16 mL) gegeben und die entstehende Mischung anschließend für 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde die Lösung auf -50 °C abgekühlt und eine Suspension von Cu(I)I (45 mg) in THF (4.5 mL) hinzugefügt. Nach dem Rühren für 10 Minuten bei dieser Temperatur wurde langsam (*S*)-(+)-Epichlorohydrin (1.2 eq, 5.64 mmol, 464  $\mu$ L) in THF (4.5 mL) hinzuge tropft und das Reaktionsgemisch für weitere drei Stunden unter Erwärmung auf -30 °C gerührt. Nach der Zugabe von gesättigter NH<sub>4</sub>Cl-Lösung (20 mL) wurde die wässrige Phase dreimal mit Ethylacetat (30 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, das Lösungsmittel entfernt und das Produkt säulenchromatographisch (17 % Ethylacetat in Cyclohexan) gereinigt. (*S*)-1-Chloro-11-((4*S*,5*S*)-2,2-dimethyl-5-vinyl-1,3-dioxolan-4-yl)undecan-2-ol (**7**, 0.76 g, 2.27 mmol, 48 %) wurde als klares, schwach gelbes Öl erhalten.

## Experimenteller Teil

TLC (17 % Ethylacetat in Cyclohexan):  $R_f$  = 0.33.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  5.80 (ddd,  $J$  = 17.4, 10.3, 7.4 Hz, 1H), 5.36 (d,  $J$  = 17.1 Hz, 1H), 5.24 (d,  $J$  = 10.3 Hz, 1H), 3.97 (t,  $J$  = 7.9 Hz, 1H), 3.79 (ddd,  $J$  = 12.4, 7.2, 3.3 Hz, 1H), 3.67 (ddd,  $J$  = 14.6, 11.5, 6.6 Hz, 2H), 3.47 (dd,  $J$  = 11.1, 7.2 Hz, 1H), 1.58 - 1.49 (m, 4H), 1.41 (d,  $J$  = 4.1 Hz, 6H), 1.27 (s, 14H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  135.5, 118.7, 108.4, 82.8, 80.7, 71.4, 50.6, 34.2, 31.9, 29.7, 29.5, 29.4, 27.3, 26.9, 26.0, 25.5.

(*R*)-11-((4*S*,5*S*)-2,2-dimethyl-5-vinyl-1,3-dioxolan-4-yl)undecan-2-ol (**88**)

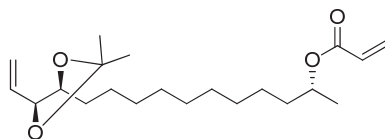


Zu einer Lösung von (*S*)-1-Chloro-11-((4*S*,5*S*)-2,2-dimethyl-5-vinyl-1,3-dioxolan-4-yl)undecan-2-ol (**7**, 1.0 eq, 121 mg, 0.37 mmol) in THF (5 mL) wurde bei 0 °C unter Argon langsam  $\text{LiAlH}_4$  (1.1 eq, 0.4 mmol, 16 mg) hinzugefügt und die entstehende Mischung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das überschüssige Hydrid wurde bei 0 °C durch Zugabe von Ethylacetat (1.1 mL) und  $\text{H}_2\text{O}$  (270  $\mu\text{L}$ ) gequencht. Die Mischung wurde für 10 Minuten gerührt, dann wurde KF (5.4 eq, 118 mg, 2.02 mmol) zugegeben. Die Lösung wurde für weitere 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, über Celite gefiltert, der Filterkuchen mit Ethylacetat gewaschen und das Lösungsmittel entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (17 % Ethylacetat in Cyclohexan) wurde dann (*R*)-11-((4*S*,5*S*)-2,2-dimethyl-5-vinyl-1,3-dioxolan-4-yl)undecan-2-ol (**88**, 99.6 mg, 0.33 mmol, 90 %) als klares, farbloses Öl erhalten.

TLC (17% Ethylacetat in Cyclohexan):  $R_f$  = 0.34.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.80 (ddd,  $J$  = 17.4, 10.3, 7.3 Hz, 1H), 5.39 – 5.32 (m, 1H), 5.25 – 5.22 (m, 1H), 3.98 (dd,  $J$  = 8.1, 7.5 Hz, 1H), 3.79 (dd,  $J$  = 12.1, 6.1 Hz, 1H), 3.70 – 3.63 (m, 1H), 1.62 (s, 2H), 1.55 (dt,  $J$  = 7.4, 6.6 Hz, 2H), 1.41 (d,  $J$  = 4.2 Hz, 6H), 1.27 (s, 14H), 1.18 (d,  $J$  = 6.2 Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  135.5, 118.7, 108.4, 82.8, 80.7, 39.4, 31.9, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 27.3, 26.9, 26.0, 25.8, 23.5.

## Experimenteller Teil

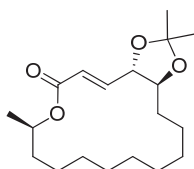
### *(R)*-11-((4*S*,5*S*)-2,2-dimethyl-5-vinyl-1,3-dioxolan-4-yl)undecan-2-yl acrylat (**8**)



Bei 0 °C wurden zu einer Lösung aus *(R)*-11-((4*S*,5*S*)-2,2-dimethyl-5-vinyl-1,3-dioxolan-4-yl)undecan-2-ol (**88**, 1.0 eq, 39 mg, 0.132 mmol) und DIPEA (2.2 eq, 57  $\mu$ L, 0.33 mmol) in DCM (6 mL) unter Argon Acryloylchlorid (2.2 eq, 25  $\mu$ L, 0.3 mmol) hinzugegeben und die entstehende Mischung für 4 Stunden bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde durch die Zugabe von gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (3 mL) die Reaktion beendet und die wässrige Phase dreimal mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (10 % Ethylacetat in Cyclohexan) wurde dann *(R)*-11-((4*S*,5*S*)-2,2-dimethyl-5-vinyl-1,3-dioxolan-4-yl)undecan-2-yl-acrylat (**8**, 45 mg, 0.13 mmol, 97 %) als klares, farbloses Öl erhalten.

TLC (10% Ethylacetat in Cyclohexan):  $R_f$  = 0.56. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  6.38 (dd,  $J$  = 17.3, 1.5 Hz, 1H), 6.10 (dd,  $J$  = 17.3, 10.4 Hz, 1H), 5.80 (tt,  $J$  = 7.7, 6.8 Hz, 2H), 5.36 (d,  $J$  = 17.1 Hz, 1H), 5.24 (d,  $J$  = 10.3 Hz, 1H), 5.02 – 4.93 (m, 1H), 3.98 (t,  $J$  = 7.8 Hz, 1H), 3.67 (dt,  $J$  = 8.3, 5.9 Hz, 1H), 1.54 (dd,  $J$  = 7.7, 6.5 Hz, 2H), 1.41 (d,  $J$  = 4.2 Hz, 6H), 1.38 – 1.22 (m, 17H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  165.9, 135.6, 130.1, 129.1, 118.7, 108.5, 82.8, 80.7, 71.3, 35.9, 31.9, 29.7, 29.5, 29.4, 27.3, 26.9, 26.0, 25.4, 19.9.

### *(3aS,8R,17aS,E)*-2,2,8-trimethyl-9,10,11,12,13,14,15,16,17,17a-decahydro-3aH-[1,3]dioxolo[4,5-*e*][1]oxacyclohexadecin-6(8*H*)-on (**9**)



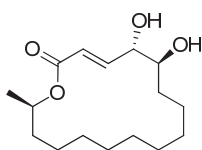
Zu einer entgasten Lösung von *(R)*-11-((4*S*,5*S*)-2,2-dimethyl-5-vinyl-1,3-dioxolan-4-yl)undecan-2-yl-acrylat (**8**, 1.0 eq, 60 mg, 0.17 mmol) in DCM (30 mL) wurde bei 50 °C und unter Argon über 8 Stunden eine Lösung des Grubbs 2<sup>nd</sup> Generation-

## Experimenteller Teil

Katalysators (0.15 eq, 23 mg, 0.025 mmol) in entgastem DCM (10 mL) hinzugetropft und das Reaktionsgemisch im Anschluss bei 50 °C über Nacht gerührt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels und einer säulenchromatographischen Reinigung (10 % Ethylacetat in Cyclohexan) wurde dann (3a*S*,8*R*,17a*S*,*E*)-2,2,8-trimethyl-9,10,11,12,13,14,15,16,17,17a-decahydro-3aH[1,3]dioxolo[4,5e][1]oxacyclohexadecin-6(8H)-on (**9**, 46.3 mg, 0.14 mmol, 84 %) als schwach beigen, kristallinen Feststoff erhalten.

TLC (10% Ethylacetat in Cyclohexan):  $R_f$  = 0.50.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.89 (dd,  $J$  = 15.7, 6.8 Hz, 1H), 6.12 (dd,  $J$  = 15.7, 1.1 Hz, 1H), 5.03 (ddd,  $J$  = 9.0, 6.2, 2.6 Hz, 1H), 4.13 (ddd,  $J$  = 8.1, 6.8, 1.1 Hz, 1H), 3.75 (td,  $J$  = 8.2, 5.3 Hz, 1H), 1.87 – 1.76 (m, 1H), 1.69 – 1.58 (m, 3H), 1.43 (d,  $J$  = 3.8 Hz, 6H), 1.40 – 1.20 (m, 13H), 1.27 (d,  $J$  = 6.3 Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  165.5, 144.3, 123.6, 109.3, 80.8, 80.1, 71.2, 35.3, 31.1, 27.9, 27.3, 27.2, 27.0, 26.6, 26.5, 24.8, 23.4, 20.5.

(5*S*,6*S*,16*R*,*E*)-5,6-dihydroxy-16-methyloxacyclohexadec-3-en-2-on (**89**)



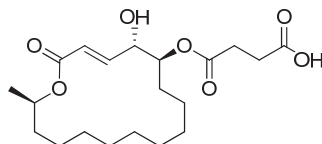
Zu einer gerührten Lösung von (3a*S*,8*R*,17a*S*,*E*)-2,2,8-trimethyl-9,10,11,12,13,14,15,16,17,17a-decahydro-3aH[1,3]-dioxolo[4,5e][1]oxacyclohexadecin-6(8H)-on (**9**, 100 mg, 0.31 mmol) in MeCN/H<sub>2</sub>O (2:1, 4 mL) wurde bei 0 °C TFA (2.4 mL) zugetropft und die entstandene Reaktionsmischung unter Erwärmen auf Raumtemperatur für eine weitere Stunde gerührt. Die Reaktionslösung wurde dann mit DCM (100 mL) verdünnt und mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (30 mL) gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phasen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Abziehen des Lösungsmittels im Vakuum und säulenchromatographischer Reinigung (40 % Aceton in Cyclohexan) wurde dann (5*S*,6*S*,16*R*,*E*)-5,6-dihydroxy-16-methyloxacyclohexadec-3-en-2-on (**89**, 80.7 mg, 0.28 mmol, 92 %) als weißer, kristalliner Feststoff erhalten.

TLC (40% Aceton in Cyclohexan):  $R_f$  = 0.50.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.92 (dd,  $J$  = 15.7, 5.5 Hz, 1H), 6.12 (dd,  $J$  = 15.7, 1.4 Hz, 1H), 4.98 (ddd,  $J$  = 9.1, 6.2, 2.8 Hz, 1H), 4.10 (ddd,  $J$  = 8.7, 5.5, 1.4 Hz, 1H), 3.38 (ddd,  $J$  = 10.3, 7.4, 3.0 Hz, 1H), 1.65 –

## Experimenteller Teil

1.41 (m, 6H), 1.41 – 1.27 (m, 12H), 1.26 (d,  $J = 6.3$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  165.6, 145.5, 123.0, 75.4, 74.9, 71.6, 35.6, 30.6, 27.8, 27.2, 27.0, 26.1, 25.7, 24.0, 22.6, 20.5.

*4-(((5S,6S,16R,E)-5-hydroxy-16-methyl-2-oxooxacyclohexadec-3-en-6-yl)oxy)-4-oxobutansäure (90)*

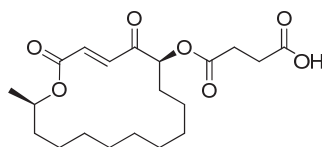


Zu einer Suspension von (5S,6S,16R,E)-5,6-dihydroxy-16-methyloxacyclohexadec-3-en-2-on (**89**, 1.0 eq, 21.9 mg, 0.077 mmol) in DCM (2 mL) wurde unter Argon Bernsteinsäureanhydrid (2.0 eq, 0.154 mmol, 15.4 mg) und DIPEA (37  $\mu\text{L}$ ) hinzugegeben und für 2 Stunden bei 50 °C gerührt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden Ethylacetat (5 mL) und  $\text{H}_2\text{O}$  (5 mL) hinzugefügt, die wässrige Phase mit 1N HCl auf pH 1 angesäuert und anschließend dreimal mit Ethylacetat (10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet, zur Trockne eingedampft und der Rückstand durch säulenchromatographische Reinigung (40 % Aceton in Hexan) aufgereinigt, so dass 4-(((5S,6S,16R,E)-5-hydroxy-16-methyl-2-oxooxacyclohexadec-3-en-6-yl)oxy)-4-oxobutansäure (**90**, 16.6 mg, 0.043 mmol, 56 %) als weißer, kristalliner Feststoff erhalten wurde.

TLC (40% Aceton in Hexan):  $R_f = 0.07$ .  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.89 (dd,  $J = 15.7, 5.4$  Hz, 1H), 6.16 (dd,  $J = 15.7, 1.5$  Hz, 1H), 4.96 - 5.01 (m, 1H), 4.80 - 4.85 (m, 1H), 4.33 - 4.37 (m, 1H), 2.59 - 2.71 (m, 4H), 1.26 - 1.61 (m, 18H), 1.26 (d,  $J = 6.3$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  176.4, 172.5, 165.4, 144.1, 123.7, 77.7, 72.8, 71.6, 35.4, 29.3, 29.0, 28.9, 27.7, 27.2, 27.0, 26.1, 25.8, 23.7, 22.1, 20.3. LC-MS (ESI):  $t_R$  8.10 min,  $m/z$  383.88  $[\text{M}-\text{H}]^-$ , 384.21 berechnet für  $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_7$ .

## Experimenteller Teil

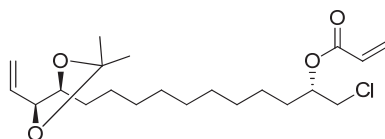
### (-)-A26771B (**1**)



Zu einer Lösung von 4-(((5*S*,6*S*,16*R*,*E*)-5-hydroxy-16-methyl-2-oxooxacyclohexadec-3-en-6-yl)oxy)-4-oxobutansäure (**90**, 1.0 eq, 16.6 mg, 0.043 mmol) in DCM (2 mL) wurde unter einer Argonatmosphäre Dess-Martin-Periodinan (1.0 eq, 0.043 mmol, 19.6 mg) hinzugefügt und für 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt und das Produkt säulenchromatographisch gereinigt (11 % Ethanol in Chloroform), so dass (-)-A26771B (**1**, 13.4 mg, 0.035 mmol, 81 %) als weißer, kristalliner Feststoff erhalten werden konnte.

TLC (11 % Ethanol in Chloroform):  $R_f = 0.54$ .  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.21 (d,  $J = 15.61\text{ Hz}$ ), 6.75 (d,  $J = 15.6$ , 1H), 5.32 (t,  $J = 5.2\text{ Hz}$ , 1H), 5.10 - 5.18 (m, 1H), 2.70 - 2.77 (m, 4H), 1.82 - 1.94 (m, 2H), 1.64 - 1.73 (m, 2H), 1.55 - 1.60 (m, 2H), 1.25 - 1.46 (m, 10H), 1.26 (d,  $J = 6.3\text{ Hz}$ , 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  195.4, 177.0, 171.4, 164.5, 135.3, 132.5, 77.9, 72.6, 34.5, 28.8, 28.6, 28.5, 28.0, 27.9, 27.3, 27.1, 26.9, 23.6, 22.3, 19.8. LC-MS (ESI):  $t_R$  8.58 min,  $m/z$  381.35  $[\text{M-H}]^-$ , 382.20 berechnet für  $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_7$ .

### (*S*)-1-Chloro-11-((4*S*,5*S*)-2,2-dimethyl-5-vinyl-1,3-dioxolan-4-yl)undecan-2-ylacrylat (**17**)

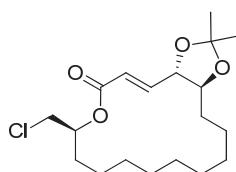


Die Synthese von (*S*)-1-Chloro-11-((4*S*,5*S*)-2,2-dimethyl-5-vinyl-1,3-dioxolan-4-yl)undecan-2-ylacrylat (**17**) erfolgte analog der Synthese von **8**. Dazu wurde **7** (1.0 eq, 567 mg, 1.70 mmol) mit DIPEA (2.2 eq, 640  $\mu\text{L}$ , 3.74 mmol) und Acryloylchlorid (2.2 eq, 320  $\mu\text{L}$ , 3.74 mmol) in DCM (30 mL) umgesetzt, so dass **17** (645 mg, 1.66 mmol, 98 %) nach säulenchromatographischer Reinigung (10 % Ethylacetat in Cyclohexan) als schwach gelbes, klares Öl erhalten wurde.

## Experimenteller Teil

TLC (10 % Ethylacetat in Cyclohexan):  $R_f$  = 0.48.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.44 (dd,  $J$  = 17.3, 1.3 Hz, 1H), 6.14 (dd,  $J$  = 17.3, 10.4 Hz, 1H), 5.87 (dd,  $J$  = 10.4, 1.3 Hz, 1H), 5.84 – 5.74 (m, 1H), 5.35 (d,  $J$  = 17.1 Hz, 1H), 5.24 (d,  $J$  = 10.3 Hz, 1H), 5.15 – 5.07 (m, 1H), 3.97 (t,  $J$  = 7.9 Hz, 1H), 3.70 – 3.57 (m, 3H), 1.71 (dd,  $J$  = 13.9, 6.8 Hz, 2H), 1.54 (dd,  $J$  = 14.5, 6.7 Hz, 2H), 1.41 (d,  $J$  = 4.1 Hz, 6H), 1.27 (dd,  $J$  = 9.8, 6.2 Hz, 14H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  165.6, 135.5, 131.3, 128.2, 118.8, 108.4, 82.8, 80.7, 73.0, 45.7, 31.9, 31.5, 29.7, 29.4, 29.4, 29.4, 29.3, 27.3, 26.9, 26.0, 25.0.

(3a*S*,8*S*,17a*S*,*E*)-8-(Chloromethyl)-2,2-dimethyl-9,10,11,12,13,14,15,16,17,17a-decahydro-3a*H*-[1,3]dioxolo[4,5-*e*][1]oxacyclohexadecin-6(8*H*)-on (**91**)



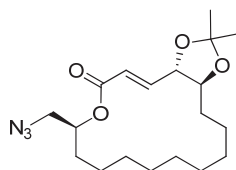
Die Darstellung von (3a*S*,8*S*,17a*S*,*E*)-8-(Chloromethyl)-2,2-dimethyl-9,10,11,12,13,14,15,16,17,17a-decahydro-3a*H*-[1,3]dioxolo[4,5-*e*][1]oxacyclohexadecin-6(8*H*)-on (**91**) erfolgte analog der Synthese von **9**. Dazu wurde **17** (1.0 eq, 590 mg, 1.52 mmol) mit dem Grubbs 2<sup>nd</sup> Generation-Katalysator (0.15 eq, 210 mg, 0.22 mmol) in entgastem DCM (360 mL) umgesetzt, so dass nach säulenchromatographischer Reinigung (10 % Ethylacetat in Cyclohexan) **91** (395 mg, 1.10 mmol, 72 %) als schwach beiger, kristalliner Feststoff erhalten wurde.

TLC (10 % Ethylacetat in Cyclohexan):  $R_f$  = 0.45.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.94 (dd,  $J$  = 15.7, 6.9 Hz, 1H), 6.16 (dd,  $J$  = 15.7, 1.0 Hz, 1H), 5.13 (tdd,  $J$  = 8.1, 5.3, 2.7 Hz, 1H), 4.14 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 1H), 3.76 (td,  $J$  = 8.1, 5.3 Hz, 1H), 3.61 (d,  $J$  = 5.4 Hz, 2H), 1.82 – 1.72 (m, 2H), 1.66 (d,  $J$  = 5.9 Hz, 2H), 1.43 (d,  $J$  = 3.8 Hz, 6H), 1.35 – 1.18 (m, 14H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  165.2, 145.6, 122.9, 109.4, 80.7, 80.0, 73.0, 45.8, 31.0, 30.9, 27.8, 27.3, 27.2, 27.0, 26.6, 26.5, 24.8, 23.0.



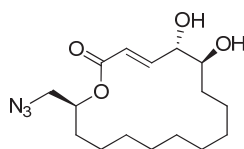
## Experimenteller Teil

(3a*S*,8*S*,17a*S*,*E*)-8-(Azidomethyl)-2,2-dimethyl-9,10,11,12,13,14,15,16,17,17a-decahydro-3a*H*-[1,3]dioxolo[4,5-*e*][1]oxacyclohexadecin-6(8*H*)-on (**18**)



Zu einer (3a*S*,8*S*,17a*S*,*E*)-8-(Chloromethyl)-2,2-dimethyl-9,10,11,12,13,14,15,16,17,17a-decahydro-3a*H*-[1,3]dioxolo[4,5-*e*][1]oxacyclohexadecin-6(8*H*)-on Lösung (**91**, 1.0 eq, 17 mg, 47.4  $\mu$ mol) in DMF (1.2 mL) wurde unter Argon Natriumazid (1.3 eq, 3.8 mg, 60  $\mu$ mol) hinzugefügt und das Reaktionsgemisch für 48 Stunden bei 100 °C gerührt. Nach dem Abkühlen der Reaktionsmischung auf Raumtemperatur wurde Diethylether (20 mL) zugegeben, das Gemisch zweimal mit gesättigter NaCl-Lösung (5 mL) gewaschen, die organische Phase über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (10 % Ethylacetat in Cyclohexan) wurde (3a*S*,8*S*,17a*S*,*E*)-8-(Azidomethyl)-2,2-dimethyl-9,10,11,12,13,14,15,16,17,17a-decahydro-3a*H*-[1,3]dioxolo[4,5-*e*][1]oxacyclohexadecin-6(8*H*)-on (**18**, 5.6 mg, 15.3  $\mu$ mol, 32 %) als weißer Feststoff erhalten. TLC (10 % Ethylacetat in Cyclohexan): *R*<sub>f</sub> = 0.40. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  6.95 (dd, *J* = 15.7, 7.0 Hz, 1H), 6.16 (dd, *J* = 15.7, 1.0 Hz, 1H), 5.12 (dt, *J* = 10.5, 5.6 Hz, 1H), 4.13 (dd, *J* = 14.0, 6.7 Hz, 1H), 3.76 (td, *J* = 8.1, 5.3 Hz, 1H), 3.46 – 3.33 (m, 2H), 1.86 – 1.75 (m, 1H), 1.69 – 1.60 (m, 3H), 1.43 (d, *J* = 2.8 Hz, 6H), 1.30 (s, 14H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  165.2, 145.7, 122.9, 109.4, 80.8, 80.0, 72.6, 54.1, 30.9, 27.8, 27.3, 27.2, 27.1, 27.0, 26.9, 26.6, 26.5, 24.8, 23.0.

(5*S*,6*S*,16*S*,*E*)-16-(azidomethyl)-5,6-dihydroxyoxacyclohexadec-3-en-2-on (**92**)



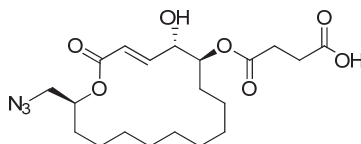
Die Synthese von (5*S*,6*S*,16*S*,*E*)-16-(Azidomethyl)-5,6-dihydroxyoxacyclohexadec-3-en-2-on (**92**) erfolgte analog der Synthese von **89**. Dazu wurde **18** (8.5 mg, 23  $\mu$ mol) mit TFA (180  $\mu$ L) in MeCN/H<sub>2</sub>O (2:1, 400  $\mu$ L) umgesetzt. Nach

## Experimenteller Teil

säulenchromatographischer Reinigung (40 % Aceton in Cyclohexan) wurde dann **92** (6.5 mg, 20  $\mu$ mol, 87 %) als ein transparenter, glasiger Feststoff erhalten.

TLC (40 % Aceton in Cyclohexan):  $R_f$  = 0.46.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.99 (dd,  $J$  = 15.7, 5.7 Hz, 1H), 6.17 (dd,  $J$  = 15.7, 1.3 Hz, 1H), 5.08 (dd,  $J$  = 13.1, 9.3 Hz, 1H), 4.12 (dd,  $J$  = 7.4, 5.8 Hz, 1H), 3.47 (dd,  $J$  = 12.9, 4.4 Hz, 1H), 3.38 (dt,  $J$  = 13.0, 6.7 Hz, 2H), 1.72 - 1.59 (m, 4H), 1.25 (s, 14H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  165.2, 146.1, 122.2, 75.4, 74.9, 72.9, 54.0, 31.3, 30.6, 29.7, 27.7, 27.2, 26.9, 26.0, 25.6, 23.8, 22.7.

4-(((5*S*,6*S*,16*S*,*E*)-16-(Azidomethyl)-5-hydroxy-2-oxooxacyclohexadec-3-en-6-yl)oxy)-4-oxobutanoesäure (**93**)

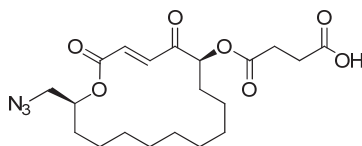


Die Synthese von 4-(((5*S*,6*S*,16*S*,*E*)-16-(Azidomethyl)-5-hydroxy-2-oxooxacyclohexadec-3-en-6-yl)oxy)-4-oxobutanoesäure (**93**) erfolgte analog der Synthese von **90**. Dazu wurde **92** (1.0 eq, 13.6 mg, 42  $\mu$ mol) mit Bernsteinsäureanhydrid (1.2 eq, 5 mg, 50  $\mu$ mol) und DIPEA (14  $\mu$ L) in DCM (2 mL) umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (40 % Aceton in Cyclohexan) wurde dann **93** (13.4 mg, 31  $\mu$ mol, 75 %) als weißer Feststoff erhalten.

TLC (40 % Aceton in Cyclohexan):  $R_f$  = 0.11.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.96 (dd,  $J$  = 15.7, 5.7 Hz, 1H), 6.21 (dd,  $J$  = 15.7, 1.5 Hz, 1H), 5.05 - 5.12 (m, 1H), 4.81 - 4.85 (m, 1H), 4.34 - 4.40 (m, 1H), 3.43 - 3.36 (m, 2H), 2.59 - 2.71 (m, 4H), 1.26 - 1.61 (m, 18H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  174.8, 170.9, 165.4, 145.8, 129.3, 123.2, 77.6, 73.3, 73.1, 54.4, 30.1, 28.8, 27.9, 27.5, 27.3, 26.4, 26.2, 22.7, 20.8. LC-MS (ESI):  $t_R$  7.10 min,  $m/z$  424.54  $[\text{M}-\text{H}]^-$ , 425.21 berechnet für  $\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_7$ .

## Experimenteller Teil

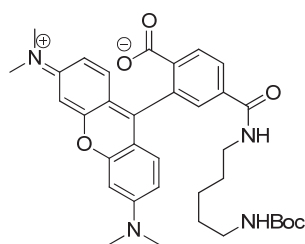
### 4-(((6S,16S,E)-16-(Azidomethyl)-2,5-dioxooxacyclohexadec-3-en-6-yl)oxy)-4-oxobutano- e Säure (**12**)



Die Synthese von 4-(((6S,16S,E)-16-(Azidomethyl)-2,5-dioxooxacyclohexadec-3-en-6-yl)oxy)-4-oxobutansäure (**12**) erfolgte analog der Synthese von **1**. Dazu wurde **93** (1.0 eq, 10 mg, 23  $\mu$ mol) mit Dess-Martin-Periodinan (1.0 eq, 10.7 mg, 23  $\mu$ mol) in DCM (1.2 mL) umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (11 % Ethanol in Chloroform) wurde dann **12** (1.2 mg, 3  $\mu$ mol, 13 %) als weißer Feststoff erhalten.

TLC (11 % Ethanol in Chloroform):  $R_f$  = 0.48.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.20 (d,  $J$  = 3.0 Hz, 1H), 6.71 (dd,  $J$  = 15.8, 1.6 Hz, 1H), 5.22 - 5.27 (m, 1H), 5.10 - 5.16 (m, 1H), 3.43 - 3.36 (m, 2H), 2.65 - 2.71 (m, 4H), 1.92 - 1.25 (m, 18H). LC-MS (ESI):  $t_R$  7.65 min,  $m/z$  422.10  $[\text{M}-\text{H}]^-$ , 423.20 berechnet für  $\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_7$ .

### 4-((5-((tert-Butoxycarbonyl)amino)pentyl)carbamoyl)-2-(6-(dimethylamino)-3-(dimethyliminio)-3H-xanthen-9-yl)benzoat (**15**)

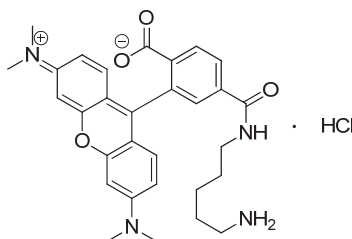


5-(und 6-)Carboxytetramethylrhodamin-succinimidylester (1.0 eq, 5.0 mg, 10  $\mu$ mol) und N-Boc-1,5-diaminopentan (5.0 eq, 10  $\mu$ L, 50  $\mu$ mol) wurden in DMF (300  $\mu$ L) gelöst und unter Argon TEA (10.0 eq, 14  $\mu$ L, 100  $\mu$ mol) hinzugefügt. Nach 2 Stunden Rühren bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und 4-((5-((tert-Butoxycarbonyl)amino)pentyl)carbamoyl)-2-(6-(dimethylamino)-3-(dimethyliminio)-3H-xanthen-9-yl)benzoat (**15**, 2.80 mg, 4.5  $\mu$ mol, 45 %) nach Reinigung über HPLC analysenrein als roter Feststoff erhalten.

LC-MS (ESI):  $t_R$  7.49 min,  $m/z$  615.27  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 614.31 berechnet für  $\text{C}_{35}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_6$ .

## Experimenteller Teil

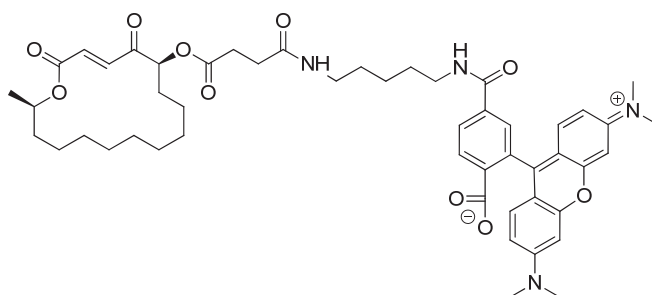
4-((5-Aminopentyl)carbamoyl)-2-(6-(dimethylamino)-3-(dimethyliminio)-3H-xanthen-9-yl)benzoat Hydrochlorid (**94**)



4N HCl / Dioxan (1 mL) wurde zu 4-((5-((*tert*-Butoxycarbonyl)amino)pentyl)carbamoyl)-2-(6-(dimethylamino)-3-(dimethyliminio)-3H-xanthen-9-yl)benzoat (**15**, 2.80 mg, 4.5  $\mu$ mol) gegeben und die Lösung für 4 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Stickstoffstrom entfernt und das Produkt über Nacht am Hochvakuum getrocknet, so dass 4-((5-Aminopentyl)carbamoyl)-2-(6-(dimethylamino)-3-(dimethyliminio)-3H-xanthen-9-yl)benzoat-hydrochlorid (**94**, 2.48 mg, 4.5  $\mu$ mol, >98 %) als roter Feststoff erhalten wurde.

LC-MS (ESI):  $t_R$  5.46 min,  $m/z$  515.40  $[M+H]^+$ , 514.26 berechnet für  $C_{30}H_{34}N_4O_4$ .

2-(6-(Dimethylamino)-3-(dimethyliminio)-3H-xanthen-9-yl)-4-((5-(4-(((6*S*,16*R*,*E*)-16-methyl-2,5-dioxooxacyclohexadec-3-en-6-yl)oxy)-4-oxobutanamido)pentyl)carbamoyl)benzoat (**13**)



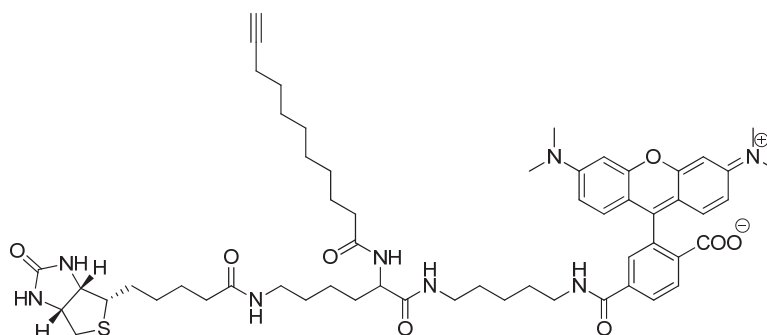
**1** (1.0 eq, 1 mg, 2.6  $\mu$ mol), TEA (13 eq, 2.5  $\mu$ L, 34  $\mu$ mol), EDC·HCl (1.3 eq, 3.4  $\mu$ mol, 0.65 mg) und HOBt (1.5 eq, 3.9  $\mu$ mol, 0.53 mg) wurden unter Argon in DCM (300  $\mu$ L) gelöst und eine Lösung von 4-((5-Aminopentyl)carbamoyl)-2-(6-(dimethylamino)-3-(dimethyliminio)-3H-xanthen-9-yl)benzoat-hydrochlorid (**94**, 1.25 eq, 1.80 mg, 3.2  $\mu$ mol) in DCM (500  $\mu$ L) hinzugefügt. Nach Rühren unter Argon über Nacht bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel entfernt und Rhodamin-pentylamin(-)-

## Experimenteller Teil

A26771B (**13**, 1.42 mg, 1.6  $\mu\text{mol}$ , 62 %) nach HPLC-Aufreinigung als roter Feststoff erhalten.

LC-MS (ESI):  $t_R$  8.81 min,  $m/z$  879.60  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 878.45 berechnet für  $\text{C}_{50}\text{H}_{62}\text{N}_4\text{O}_{10}$ .

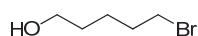
2-(6-(Dimethylamino)-3-(dimethyliminio)-3H-xanthen-9-yl)-4-((5-(6-(5-((3aS,4S,6aR)-2-oxohexahydro-1H-thieno[3,4-d]imidazol-4-yl)pentanamido)-2-(undec-10-ynamido)hexanamido)pentyl)carbamoyl)benzoat (**21**)



10-Undecansäure (1.5 eq, 0.63 mg, 3.45  $\mu\text{mol}$ ), HATU (1.3 eq, 1.14 mg) und DMAP (0.3 eq, 0.69  $\mu\text{mol}$ , 0.08 mg) wurden in DMF (300  $\mu\text{L}$ ) gelöst und eine Lösung aus Biocytin-TMR (1.0 eq, 2.0 mg, 2.3  $\mu\text{mol}$ ) und DIPEA (6 eq, 2.4  $\mu\text{L}$ , 13.8  $\mu\text{mol}$ ) in DMF (300  $\mu\text{L}$ ) hinzugefügt. Nach Rühren über Nacht bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt mit einem Gradienten (30 % MeCN in  $\text{H}_2\text{O}$  bis 100 % MeCN in 10 % Schritten) über eine C18-Silicasäule gereinigt, so dass 2-(6-(Dimethylamino)-3-(dimethyliminio)-3H-xanthen-9-yl)-4-((5-(6-(5-((3aS,4S,6aR)-2-oxohexahydro-1H-thieno[3,4-d]imidazol-4-yl)pentanamido)-2-(undec-10-ynamido)hexanamido)pentyl)carbamoyl)benzoat (**21**, 1.7 mg, 1.64  $\mu\text{mol}$ , 72 %) als roter Feststoff erhalten wurde.

LC-MS (ESI):  $t_R$  7.95 min,  $m/z$  1033.67  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 1032.55 berechnet für  $\text{C}_{57}\text{H}_{76}\text{N}_8\text{O}_8\text{S}$ .

### 5-Bromopentanol (**95**)



Die Synthese des 5-Bromopentanol (**95**) erfolgte analog der Synthese des 9-Bromononanol (**84**). Hierzu wurden 1,5-Pentandiol (**28**, 15 g, 14 mmol) und HBr

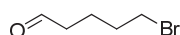
## Experimenteller Teil

---

(9M, 48%, 23 mL) in Toluol (250 mL) umgesetzt, so dass 5-Bromopentanol (**95**, 19.4 g, 116 mmol, 81 %) nach säulenchromatographischer Reinigung (50 % Ethylacetat in Cyclohexan) als beiges, klares Öl erhalten wurde.

TLC (33 % Ethylacetat in Cyclohexan):  $R_f$  = 0.41.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3.66 (t,  $J$  = 6.3 Hz, 2H), 3.41 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 2H), 1.85 - 1.93 (m, 2H), 1.57 - 1.64 (m, 2H), 1.54 - 1.49 (m, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  62.6, 33.6, 32.4, 31.7, 24.4.

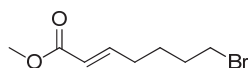
### 5-Bromopentanal (**96**)



Die Synthese des 5-Bromopentanal (**96**) erfolgte analog der Synthese von 9-Bromononanal (**84**). Hierzu wurden 5-Bromopentanol (**95**, 1.0 eq, 5.0 g, 30 mmol) mit Pyridinium-Chlorochromat (1.5 eq, 9.4 g, 45 mmol) in DCM (135 mL) und Celite (9.4 g) umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (33 % Ethylacetat in Cyclohexan) wurde 5-Bromopentanal (**96**, 4.57 g, 27.8 mmol, 93 %) als klares, schwach gelbes Öl erhalten.

TLC (33 % Ethylacetat in Cyclohexan):  $R_f$  = 0.59.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.78 (t,  $J$  = 1.5 Hz, 1H), 3.41 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 2H), 2.49 (td,  $J$  = 7.1, 1.5 Hz, 2H), 1.85 - 1.93 (m, 2H), 1.77 - 1.84 (m, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  201.7, 42.8, 32.6, 31.9, 20.6.

### (*E*)-Methyl 7-bromohept-2-enoat (**29**)

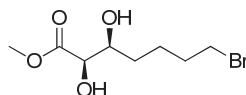


Die Darstellung von (*E*)-Methyl-7-bromohept-2-enoat (**29**) wurde analog der Synthese von (*E*)-Methyl-11-bromoundec-2-enoat (**10**) durchgeführt. Hierbei wurde 5-Bromopentanal (**96**, 1.0 eq, 6.84 g, 41.5 mmol) mit (Methoxycarbonylmethylen)-triphenylphosphoran (1.2 eq, 16.7 g, 50 mmol) in DCM (175 mL) umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (10 % Ethylacetat in Cyclohexan) erhielt man (*E*)-Methyl-7-bromohept-2-enoat (**29**, 7.74 g, 35 mmol, 84 %) als farbloses, klares Öl.

## Experimenteller Teil

TLC (10 % Ethylacetat in Cyclohexan):  $R_f = 0.31$ .  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.95 (dt,  $J = 15.6$  Hz, 7.0 Hz, 1H), 5.40 (dt,  $J = 15.7$  Hz, 1.6 Hz, 1H), 3.73 (s, 3H), 3.41 (t,  $J = 6.7$  Hz, 2H), 2.24 (qd,  $J = 7.3$  Hz, 1.5 Hz, 2H), 1.91 - 1.85 (m, 2H), 1.65 - 1.60 (m, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  166.9, 148.4, 121.4, 51.4, 33.1, 31.9, 31.2, 26.5.

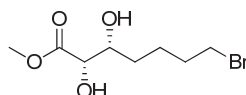
### (2*R*,3*S*)-Methyl-7-bromo-2,3-dihydroxyheptanoat (**97a**)



Die Umsetzung von **29** zu (2*R*,3*S*)-Methyl-7-bromo-2,3-dihydroxyheptanoat (**97a**) erfolgte analog der Synthese von (2*R*,3*S*)-Methyl-11-bromo-2,3-dihydroxyundecanoat (**86**). Nach der Umsetzung von (*E*)-Methyl-7-bromohept-2-enoat (**29**, 2.54 g, 11.5 mmol) mit AD-Mix  $\alpha$  (16.1 g) in  $\text{H}_2\text{O}/t\text{BuOH}$  (1:1, 120 mL) und säulenchromatographischer Reinigung (5 % Methanol in DCM) wurde (2*R*,3*S*)-Methyl-7-bromo-2,3-dihydroxyheptanoat (**97a**, 2.65 g, 10.4 mmol, 90 %) als klares, farbloses Öl erhalten.

TLC (5 % Methanol in DCM):  $R_f = 0.54$ .  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  4.10 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H), 3.92 - 3.87 (m, 1H), 3.84 (s, 3H), 3.42 (t,  $J = 6.7$  Hz, 2H), 1.96 - 1.87 (m, 2H), 1.70 - 1.52 (m, 4H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  173.8, 73.0, 72.1, 52.9, 33.4, 32.8, 32.4, 24.3.

### (2*S*,3*R*)-Methyl-7-bromo-2,3-dihydroxyheptanoat (**97b**)

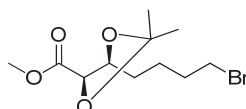


Die Umsetzung von **29** zu (2*S*,3*R*)-Methyl 7-bromo-2,3-dihydroxyheptanoat (**97b**) erfolgte analog der Synthese von (2*R*,3*S*)-Methyl-11-bromo-2,3-dihydroxyundecanoat (**86**). Nach der Umsetzung von (*E*)-Methyl-7-bromohept-2-enoat (**29**, 5.2 g, 23.5 mmol) mit AD-Mix  $\beta$  (28.7 g) in  $\text{H}_2\text{O}/t\text{BuOH}$  (1:1, 240 mL) und säulenchromatographischer Reinigung (5 % Methanol in DCM) wurde (2*S*,3*R*)-Methyl-7-bromo-2,3-dihydroxyheptanoat (**97b**, 5.36 g, 21.0 mmol, 89 %) als klares, farbloses Öl erhalten.

## Experimenteller Teil

TLC (5 % Methanol in DCM):  $R_f$  = 0.57.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  4.10 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H), 3.92 - 3.87 (m, 1H), 3.84 (s, 3H), 3.42 (t,  $J$  = 6.7 Hz, 2H), 1.96 - 1.87 (m, 2H), 1.70 - 1.52 (m, 4H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  173.9, 73.0, 72.2, 53.0, 33.6, 32.9, 32.5, 24.4.

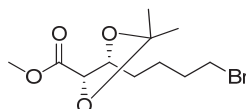
### (4*R*,5*S*)-Methyl 5-(4-bromobutyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolane-4-carboxylat (**30a**)



Die Synthese von (4*R*,5*S*)-Methyl-5-(4-bromobutyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-carboxylat (**30a**) erfolgte analog der Synthese von (4*R*,5*S*)-Methyl 5-(8-Bromooctyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-carboxylat (**11**). (2*R*,3*S*)-Methyl-7-bromo-2,3-dihydroxyheptanoat (**97a**, 1.0 eq, 946 mg, 3.7 mmol) wurde mit *p*-TsOH (0.05 eq, 37 mg, 0.18 mmol) in Aceton/2,2-Dimethoxypropan (1:1, 30 mL) zu **30a** umgesetzt, so dass nach säulenchromatographischer Reinigung (10 % Ethylacetat in Cyclohexan) (4*R*,5*S*)-Methyl 5-(4-bromobutyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolane-4-carboxylat (**30a**, 992 mg, 3.36 mmol, 91 %) als klares, farbloses Öl erhalten wurde.

TLC (10 % Ethylacetat in Cyclohexan):  $R_f$  = 0.22.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  4.12 (dd,  $J$  = 5.3, 2.7 Hz, 2H), 3.78 (s, 3H), 3.42 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 2H), 1.96 – 1.87 (m, 2H), 1.85 – 1.76 (m, 1H), 1.72 – 1.59 (m, 3H), 1.44 (d,  $J$  = 11.6 Hz, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  171.2, 110.9, 78.9, 78.8, 52.4, 33.4, 32.5, 32.5, 27.1, 25.7, 24.4.

### (4*S*,5*R*)-Methyl 5-(4-bromobutyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolane-4-carboxylat (**30b**)



Die Synthese von (4*S*,5*R*)-Methyl-5-(4-bromobutyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-carboxylat (**30b**) erfolgte analog der Synthese von (4*R*,5*S*)-Methyl-5-(8-Bromooctyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-carboxylat (**11**). (2*R*,3*S*)-Methyl-7-bromo-2,3-dihydroxyheptanoat (**97b**, 1.0 eq, 946 mg, 3.7 mmol) wurde mit *p*-TsOH (0.05 eq, 37 mg, 0.18 mmol) in Aceton/2,2-Dimethoxypropan (1:1, 30 mL) zu **30b** umgesetzt,

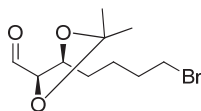


## Experimenteller Teil

so dass nach säulenchromatographischer Reinigung (10 % Ethylacetat in Cyclohexan) (4*R*,5*S*)-Methyl-5-(4-bromobutyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolane-4-carboxylat (**30b**, 992 mg, 3.36 mmol, 91 %) als klares, farbloses Öl erhalten wurde.

TLC (10 % Ethylacetat in Cyclohexan):  $R_f$  = 0.22.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  4.12 (dd,  $J$  = 5.3, 2.7 Hz, 2H), 3.78 (s, 3H), 3.41 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 2H), 1.96 – 1.87 (m, 2H), 1.85 – 1.76 (m, 1H), 1.70 – 1.58 (m, 3H), 1.44 (d,  $J$  = 11.4 Hz, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  171.2, 110.9, 78.9, 78.8, 52.4, 33.4, 32.5, 32.5, 27.1, 25.7, 24.4.

### (4*R*,5*S*)-5-(4-Bromobutyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-carbaldehyd (**98a**)

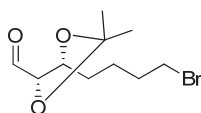


Die Synthese von (4*R*,5*S*)-5-(4-Bromobutyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-carbaldehyd (**98a**) erfolgte analog der Synthese von (4*R*,5*S*)-5-(8-Bromooctyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-carbaldehyd (**87**). Dazu wurde (4*R*,5*S*)-Methyl 5-(4-bromobutyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolane-4-carboxylat (**30a**, 1.0 eq, 1.93 g, 6.53 mmol) mit DIBAL-H (1M-Lösung, 2.5 eq, 16.3 mL, 16.3 mmol) in Toluol (65 mL) reduziert. Nach säulenchromatographischer Reinigung (16 % Ethylacetat in Cyclohexan) wurde dann (4*R*,5*S*)-5-(4-Bromobutyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-carbaldehyd (**98a**, 1.08 g, 4.09 mmol, 63 %) als klares, farbloses Öl erhalten.

TLC (33 % Ethylacetat in Cyclohexan):  $R_f$  = 0.45.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.73 (d,  $J$  = 2.2 Hz, 1H), 4.03 (td,  $J$  = 7.4, 4.8 Hz, 1H), 3.93 (dd,  $J$  = 7.6, 2.2 Hz, 1H), 3.41 (t,  $J$  = 6.7 Hz, 2H), 1.96 – 1.86 (m, 2H), 1.76 – 1.66 (m, 2H), 1.64 – 1.54 (m, 2H), 1.45 (d,  $J$  = 25.3 Hz, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  201.3, 111.0, 84.7, 60.4, 33.3, 32.4, 27.1, 26.1, 24.3.

## Experimenteller Teil

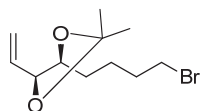
### *(4S,5R)*-5-(4-Bromobutyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-carbaldehyd (**98b**)



Die Synthese von *(4S,5R)*-5-(4-Bromobutyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-carbaldehyd (**98b**) erfolgte analog von *(4R,5S)*-5-(8-Bromooctyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-carbaldehyd (**87**). Dazu wurde *(4R,5S)*-Methyl-5-(4-bromobutyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-carboxylat (**30b**, 1.0 eq, 5.03 g, 17.0 mmol) mit DIBAL-H (1M-Lösung, 2.5 eq, 42.0 mL, 42.0 mmol) in Toluol (170 mL) reduziert. Nach säulenchromatographischer Reinigung (33 % Ethylacetat in Cyclohexan) wurde dann *(4S,5R)*-5-(4-Bromobutyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-carbaldehyd (**98b**, 3.78 g, 14.3 mmol, 84 %) als klares, farbloses Öl erhalten.

TLC (33 % Ethylacetat in Cyclohexan):  $R_f$  = 0.48.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.72 (d,  $J$  = 2.2 Hz, 1H), 4.02 (td,  $J$  = 7.4, 4.8 Hz, 1H), 3.92 (dd,  $J$  = 7.6, 2.2 Hz, 1H), 3.40 (t,  $J$  = 6.7 Hz, 2H), 1.95 – 1.84 (m, 2H), 1.77 – 1.68 (m, 2H), 1.64 – 1.54 (m, 2H), 1.46 (d,  $J$  = 25.3 Hz, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  201.3, 111.0, 84.7, 60.4, 33.3, 32.4, 27.1, 26.1, 24.3.

### *(4S,5S)*-4-(4-Bromobutyl)-2,2-dimethyl-5-vinyl-1,3-dioxolan (**31a**)

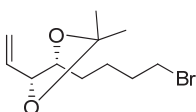


Die Umsetzung von *(4R,5S)*-5-(4-Bromobutyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-carbaldehyd (**98a**) zu *(4S,5S)*-4-(4-Bromobutyl)-2,2-dimethyl-5-vinyl-1,3-dioxolan (**31a**) erfolgte analog der Vorschrift zur Darstellung von **6**. Das Ylid wurde aus Methyltriphenylphosphoniumbromid (1.0 eq, 578 mg, 1.56 mmol) und *n*-BuLi (1.6 M Lösung, 0.92 eq, 0.9 mL, 1.44 mmol) in THF (6 mL) gebildet und anschließend mit dem Aldehyd **98a** (365 mg, 1.38 mmol) in THF (6 mL) zu *(4S,5S)*-4-(4-Bromobutyl)-2,2-dimethyl-5-vinyl-1,3-dioxolan (**31a**, 265 mg, 1.01 mmol, 73 %) umgesetzt, welches nach säulenchromatographischer Reinigung (10 % Ethylacetat in Cyclohexan) als klares, schwach gelbes Öl erhalten wurde.

## Experimenteller Teil

TLC (10 % Ethylacetat in Cyclohexan),  $R_f = 0.52$ .  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.80 (ddd,  $J = 17.4, 10.2, 7.4$  Hz, 1H), 5.37 (d,  $J = 17.1$  Hz, 1H), 5.25 (d,  $J = 10.7$  Hz, 1H), 3.98 (t,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 3.73 – 3.62 (m, 1H), 3.41 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 1.95 – 1.84 (m, 2H), 1.67 – 1.51 (m, 4H), 1.41 (d,  $J = 3.3$  Hz, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  135.3, 119.0, 108.6, 82.7, 80.3, 33.5, 32.7, 30.9, 27.3, 26.9, 24.8.

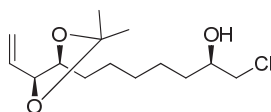
### *(4R,5R)*-4-(4-Bromobutyl)-2,2-dimethyl-5-vinyl-1,3-dioxolan (**31b**)



Die Umsetzung von *(4S,5R)*-5-(4-Bromobutyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolane-4-carbaldehyd (**98b**) zu *(4S,5S)*-4-(4-Bromobutyl)-2,2-dimethyl-5-vinyl-1,3-dioxolan (**31b**) erfolgte analog der Vorschrift zur Darstellung von **6**. Das Ylid wurde aus Methyltriphenylphosphoniumbromid (1.0 eq, 6.32 g, 17.1 mmol) und *n*-BuLi (1.6 M Lösung, 0.92 eq, 9.8 mL, 15.6 mmol) in THF (60 mL) gebildet und anschließend mit dem Aldehyd **98a** (3.8 g, 14.2 mmol) in THF (60 mL) zu *(4R,5R)*-4-(4-Bromobutyl)-2,2-dimethyl-5-vinyl-1,3-dioxolan (**31b**, 2.54 g, 9.6 mmol, 68 %) umgesetzt, welches nach säulenchromatographischer Reinigung (5 % Ethylacetat in Cyclohexan) als klares, schwach gelbes Öl erhalten wurde.

TLC (5 % Ethylacetat in Cyclohexan),  $R_f = 0.41$ .  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.80 (ddd,  $J = 17.4, 10.2, 7.4$  Hz, 1H), 5.37 (d,  $J = 17.1$  Hz, 1H), 5.26 (d,  $J = 10.3$  Hz, 1H), 3.98 (t,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 3.66 (dd,  $J = 8.3, 4.1$  Hz, 1H), 3.41 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 1.93 – 1.86 (m, 2H), 1.64 – 1.54 (m, 4H), 1.41 (d,  $J = 3.3$  Hz, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  135.3, 119.1, 108.6, 82.7, 80.3, 33.5, 32.7, 30.9, 27.3, 26.9, 24.8.

### *(R)*-1-Chloro-7-((4*S*,5*S*)-2,2-dimethyl-5-vinyl-1,3-dioxolan-4-yl)heptan-2-ol (**32a**)



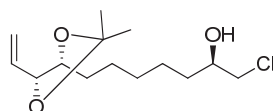
Die Synthese von *(R)*-1-Chloro-7-((4*S*,5*S*)-2,2-dimethyl-5-vinyl-1,3-dioxolan-4-yl)heptan-2-ol (**32a**) erfolgte analog der Darstellung von *(S)*-1-Chloro-11-((4*S*,5*S*)-

## Experimenteller Teil

2,2-dimethyl-5-vinyl-1,3-dioxolan-4-yl)undecan-2-ol (**7**). Dazu wurde (4*S*,5*S*)-4-(4-Bromobutyl)-2,2-dimethyl-5-vinyl-1,3-dioxolan (**31a**, 1.0 eq, 640 mg, 2.43 mmol) mit Rieke-Magnesium (Suspension von 2.5 g in 100 mL THF, 1.45 eq, 4 mL, 3.5 mmol) in THF (2 mL) zur entsprechenden metallorganischen Spezies umgesetzt und diese anschließend mit (*R*)-(-)-Epichlorohydrin (1.15 eq, 232  $\mu$ L, 2.80 mmol) und Cu(I)I (25 mg) in THF (4 mL) umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (16 % Ethylacetat in Cyclohexan) wurde so (*R*)-1-Chloro-7-((4*S*,5*S*)-2,2-dimethyl-5-vinyl-1,3-dioxolan-4-yl)heptan-2-ol (**32a**, 300 mg, 1.08 mmol, 45 %) als schwach beiges, klares Öl erhalten.

TLC (16 % Ethylacetat in Cyclohexan),  $R_f$  = 0.30.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.79 (ddd,  $J$  = 17.4, 10.2, 7.4 Hz, 1H), 5.35 (d,  $J$  = 17.1 Hz, 1H), 5.24 (d,  $J$  = 10.3 Hz, 1H), 3.97 (t,  $J$  = 7.9 Hz, 1H), 3.83 – 3.76 (m, 1H), 3.72 – 3.56 (m, 3H), 3.47 (dd,  $J$  = 11.1, 7.1 Hz, 1H), 1.60 – 1.44 (m, 6H), 1.41 (d,  $J$  = 3.4 Hz, 6H), 1.36 (s, 4H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  135.5, 118.8, 108.5, 82.7, 80.6, 71.3, 50.5, 34.1, 31.7, 29.5, 27.3, 26.9, 25.9, 25.3.

(*R*)-1-Chloro-7-((4*R*,5*R*)-2,2-dimethyl-5-vinyl-1,3-dioxolan-4-yl)heptan-2-ol (**32b**)



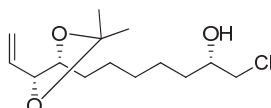
Die Synthese von (*R*)-1-Chloro-7-((4*R*,5*R*)-2,2-dimethyl-5-vinyl-1,3-dioxolan-4-yl)heptan-2-ol (**32b**) erfolgte analog der Darstellung von **7**. Dazu wurde (4*R*,5*R*)-4-(4-Bromobutyl)-2,2-dimethyl-5-vinyl-1,3-dioxolan (**31b**, 1.0 eq, 1.27 g, 4.81 mmol) mit Rieke-Magnesium (Suspension von 2.5 g in 100 mL THF, 1.9 eq, 10 mL, 9 mmol) in THF (4 mL) zur entsprechenden metallorganischen Spezies umgesetzt und dieses anschließend mit (*R*)-(-)-Epichlorohydrin (1.15 eq, 464  $\mu$ L, 5.60 mmol) und Cu(I)I (45 mg) in THF (8 mL) umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (16 % Ethylacetat in Cyclohexan) wurde (*R*)-1-Chloro-7-((4*R*,5*R*)-2,2-dimethyl-5-vinyl-1,3-dioxolan-4-yl)heptan-2-ol (**32b**, 638 mg, 2.30 mmol, 48 %) als schwach beiges, klares Öl erhalten.

TLC (33 % Ethylacetat in Cyclohexan),  $R_f$  = 0.54.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.80 (ddd,  $J$  = 17.4, 10.3, 7.4 Hz, 1H), 5.36 (d,  $J$  = 17.1 Hz, 1H), 5.24 (d,  $J$  = 10.3 Hz, 1H), 3.97 (t,  $J$  = 7.9 Hz, 1H), 3.79 (dt,  $J$  = 7.0, 6.0 Hz, 1H), 3.72 – 3.56 (m, 3H), 3.47 (dd,

## Experimenteller Teil

$J = 11.1, 7.1$  Hz, 1H), 1.64 – 1.45 (m, 6H), 1.41 (t,  $J = 3.4$  Hz, 6H), 1.37 (s, 4H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  135.5, 118.9, 108.5, 82.7, 80.6, 71.4, 50.6, 34.1, 31.7, 29.5, 27.3, 26.9, 25.9, 25.4.

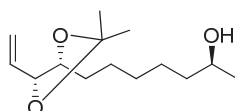
### (*S*)-1-Chloro-7-((4*R*,5*R*)-2,2-dimethyl-5-vinyl-1,3-dioxolan-4-yl)heptan-2-ol (**32c**)



Die Synthese von (*S*)-1-Chloro-7-((4*R*,5*R*)-2,2-dimethyl-5-vinyl-1,3-dioxolan-4-yl)heptan-2-ol (**32c**) erfolgte analog der Darstellung von **7**. Dazu wurde (4*R*,5*R*)-4-(4-Bromobutyl)-2,2-dimethyl-5-vinyl-1,3-dioxolan (**31b**, 1.0 eq, 1.23 g, 4.69 mmol) mit Rieke-Magnesium (Suspension von 2.5 g in 100 mL THF, 1.5 eq, 7.8 mL, 7 mmol) in THF (4 mL) zur entsprechenden metallorganischen Spezies umgesetzt und dieses anschließend mit (*S*)-(+)-Epichlorohydrin (1.15 eq, 447  $\mu\text{L}$ , 5.39 mmol) und Cu(I)I (45 mg) in THF (8 mL) umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (16 % Ethylacetat in Cyclohexan) wurde (*S*)-1-Chloro-7-((4*R*,5*R*)-2,2-dimethyl-5-vinyl-1,3-dioxolan-4-yl)heptan-2-ol (**32c**, 701 mg, 2.53 mmol, 54 %) als schwach beiges, klares Öl erhalten.

TLC (16 % Ethylacetat in Cyclohexan),  $R_f = 0.23$ .  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.79 (ddd,  $J = 17.4, 10.3, 7.4$  Hz, 1H), 5.35 (d,  $J = 17.0$  Hz, 1H), 5.24 (d,  $J = 10.3$  Hz, 1H), 3.97 (t,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 3.84 – 3.75 (m, 1H), 3.72 – 3.56 (m, 3H), 3.47 (dd,  $J = 11.1, 7.1$  Hz, 1H), 1.59 – 1.44 (m, 6H), 1.41 (d,  $J = 3.4$  Hz, 6H), 1.37 (s, 4H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  135.5, 118.8, 108.5, 82.7, 80.6, 71.3, 50.5, 34.1, 31.7, 29.5, 27.3, 26.9, 25.9, 25.3.

### (*S*)-7-((4*R*,5*R*)-2,2-Dimethyl-5-vinyl-1,3-dioxolan-4-yl)heptan-2-ol (**99b**)



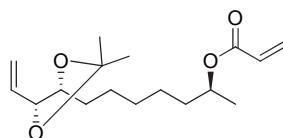
Die Synthese von (*S*)-7-((4*R*,5*R*)-2,2-Dimethyl-5-vinyl-1,3-dioxolan-4-yl)heptan-2-ol (**99b**) erfolgte analog der Darstellung von **88**. (*R*)-1-Chloro-7-((4*R*,5*R*)-2,2-dimethyl-

## Experimenteller Teil

5-vinyl-1,3-dioxolan-4-yl)heptan-2-ol (**32b**, 1.0 eq, 200 mg, 0.72 mmol) wurde mit  $\text{LiAlH}_4$  (1.1 eq, 32 mg, 0.80 mmol) in THF (10 mL) zu (S)-7-((4*R*,5*R*)-2,2-Dimethyl-5-vinyl-1,3-dioxolan-4-yl)heptan-2-ol (**99b**, 131 mg, 0.54 mmol, 75 %) umgesetzt, welches nach säulenchromatographischer Reinigung (16 % Ethylacetat in Cyclohexan) als klares, farbloses Öl erhalten wurde.

TLC (33 % Ethylacetat in Cyclohexan),  $R_f = 0.48$ .  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.80 (ddd,  $J = 17.4, 10.3, 7.4$  Hz, 1H), 5.36 (d,  $J = 17.1$  Hz, 1H), 5.24 (d,  $J = 10.3$  Hz, 1H), 3.97 (t,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 3.79 (dd,  $J = 12.1, 5.9$  Hz, 1H), 3.66 (dt,  $J = 8.3, 5.9$  Hz, 1H), 1.55 (dd,  $J = 13.1, 6.8$  Hz, 2H), 1.41 (d,  $J = 3.8$  Hz, 6H), 1.50 – 1.30 (m, 8H), 1.18 (d,  $J = 6.2$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  135.5, 118.8, 108.5, 82.8, 80.6, 68.1, 39.2, 31.8, 29.7, 27.3, 26.9, 26.0, 25.6, 23.5.

(S)-7-((4*S*,5*S*)-2,2-Dimethyl-5-vinyl-1,3-dioxolan-4-yl)heptan-2-yl acrylat (**33b**)

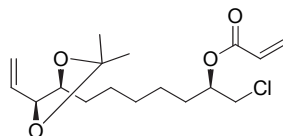


Die Umsetzung von (S)-7-((4*R*,5*R*)-2,2-Dimethyl-5-vinyl-1,3-dioxolan-4-yl)heptan-2-ol (**99b**, 1.0 eq, 129 mg, 0.53 mmol) mit Acryloylchlorid (2.2 eq, 99  $\mu\text{L}$ , 1.19 mmol) und DIPEA (225  $\mu\text{L}$ , 1.30 mmol) in DCM (8.5 mL) zu (S)-7-((4*S*,5*S*)-2,2-Dimethyl-5-vinyl-1,3-dioxolan-4-yl)heptan-2-yl acrylat (**33b**) erfolgte analog der Darstellung von **8**, so dass nach säulenchromatographischer Reinigung (10 % Ethylacetat in Cyclohexan) **33b** (138 mg, 0.47 mmol, 88 %) als klares, farbloses Öl erhalten wurde.

TLC (10 % Ethylacetat in Cyclohexan),  $R_f = 0.44$ .  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.38 (dd,  $J = 17.3, 1.5$  Hz, 1H), 6.09 (dd,  $J = 17.3, 10.4$  Hz, 1H), 5.85 – 5.74 (m, 2H), 5.35 (d,  $J = 17.0$  Hz, 1H), 5.24 (d,  $J = 10.3$  Hz, 1H), 5.02 – 4.92 (m, 1H), 3.97 (t,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 3.66 (dt,  $J = 8.3, 5.9$  Hz, 1H), 1.69 – 1.42 (m, 6H), 1.41 (d,  $J = 3.8$  Hz, 6H), 1.33 (s, 4H), 1.24 (d,  $J = 6.3$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  165.9, 135.5, 130.2, 129.0, 118.8, 108.5, 82.7, 80.6, 71.1, 35.8, 31.7, 29.5, 27.3, 26.9, 25.9, 25.2, 19.9.

## Experimenteller Teil

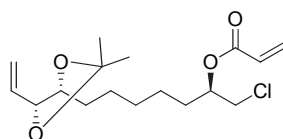
### *(R)*-1-Chloro-7-((4*S*,5*S*)-2,2-dimethyl-5-vinyl-1,3-dioxolan-4-yl)heptan-2-yl-acrylat (**34a**)



Die Synthese von (*R*)-1-Chloro-7-((4*S*,5*S*)-2,2-Dimethyl-5-vinyl-1,3-dioxolan-4-yl)heptan-2-yl-acrylat (**34a**) erfolgte analog der Synthese von **8**. Dazu wurde **32a** (1.0 eq, 150 mg, 0.54 mmol) mit DIPEA (2.5 eq, 233  $\mu$ L, 1.35 mmol) und Acryloylchlorid (2.2 eq, 99  $\mu$ L, 1.19 mmol) in DCM (7 mL) umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (10 % Ethylacetat in Cyclohexan) wurde dann **34a** (86 mg, 0.26 mmol, 48 %) als schwach gelbes, klares Öl erhalten.

TLC (10 % Ethylacetat in Cyclohexan),  $R_f$  = 0.36.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.44 (dd,  $J$  = 17.3, 1.4 Hz, 1H), 6.14 (dd,  $J$  = 17.3, 10.4 Hz, 1H), 5.87 (dd,  $J$  = 10.4, 1.4 Hz, 1H), 5.79 (ddd,  $J$  = 17.3, 10.3, 7.4 Hz, 1H), 5.38 – 5.32 (m, 1H), 5.24 (d,  $J$  = 10.3 Hz, 1H), 5.11 (ddd,  $J$  = 11.3, 6.5, 5.1 Hz, 1H), 3.97 (t,  $J$  = 7.8 Hz, 1H), 3.67 – 3.58 (m, 3H), 1.72 (q,  $J$  = 6.4 Hz, 2H), 1.63 – 1.43 (m, 4H), 1.40 (d,  $J$  = 4.6 Hz, 6H), 1.39 – 1.31 (m, 4H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  165.5, 135.5, 131.3, 128.2, 118.8, 108.5, 82.7, 80.6, 72.9, 45.6, 31.7, 31.4, 29.4, 27.3, 26.9, 25.9, 24.9.

### *(R)*-1-Chloro-7-((4*R*,5*R*)-2,2-dimethyl-5-vinyl-1,3-dioxolan-4-yl)heptan-2-yl-acrylat (**34b**)

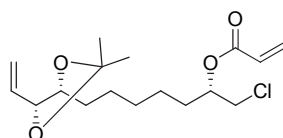


Die Synthese von (*R*)-1-Chloro-7-((4*R*,5*R*)-2,2-dimethyl-5-vinyl-1,3-dioxolan-4-yl)heptan-2-yl-acrylat (**34b**) erfolgte analog der Synthese von **8**. Dazu wurde **32b** (1.0 eq, 200 mg, 0.72 mmol) mit DIPEA (2.5 eq, 306  $\mu$ L, 1.77 mmol) und Acryloylchlorid (2.2 eq, 134  $\mu$ L, 1.61 mmol) in DCM (12 mL) umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (10 % Ethylacetat in Cyclohexan) wurde dann **34b** (218 mg, 0.66 mmol, 92 %) als schwach gelbes, klares Öl erhalten.

## Experimenteller Teil

TLC (10 % Ethylacetat in Cyclohexan),  $R_f$  = 0.33.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.44 (dd,  $J$  = 17.3, 1.3 Hz, 1H), 6.14 (dd,  $J$  = 17.3, 10.4 Hz, 1H), 5.87 (dd,  $J$  = 10.4, 1.3 Hz, 1H), 5.79 (ddd,  $J$  = 17.4, 10.2, 7.4 Hz, 1H), 5.35 (d,  $J$  = 17.1 Hz, 1H), 5.24 (d,  $J$  = 10.3 Hz, 1H), 5.15 – 5.07 (m, 1H), 3.96 (t,  $J$  = 7.9 Hz, 1H), 3.64 (ddd,  $J$  = 11.6, 8.2, 5.1 Hz, 3H), 1.72 (q,  $J$  = 6.3 Hz, 2H), 1.63 – 1.42 (m, 4H), 1.41 (d,  $J$  = 3.3 Hz, 6H), 1.35 (s, 4H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  165.6, 135.4, 131.4, 128.2, 118.9, 108.5, 82.7, 80.5, 72.9, 45.6, 31.6, 31.4, 29.3, 27.3, 26.9, 25.9, 24.8.

*(S)*-1-Chloro-7-((4*R*,5*R*)-2,2-dimethyl-5-vinyl-1,3-dioxolan-4-yl)heptan-2-yl-acrylat  
**(34c)**



Die Synthese von (*R*)-1-Chloro-7-((4*R*,5*R*)-2,2-dimethyl-5-vinyl-1,3-dioxolan-4-yl)heptan-2-yl-acrylat (**34c**) erfolgte analog der Synthese von **8**. Dazu wurde **32c** (1.0 eq, 300 mg, 1.08 mmol) mit DIPEA (2.5 eq, 466  $\mu\text{L}$ , 2.70 mmol) und Acryloylchlorid (2.2 eq, 198  $\mu\text{L}$ , 2.38 mmol) in DCM (15 mL) umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (10 % Ethylacetat in Cyclohexan) wurde dann **34c** (260 mg, 0.79 mmol, 73 %) als schwach gelbes, klares Öl erhalten.

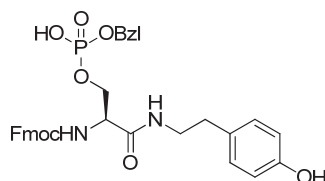
TLC (10 % Ethylacetat in Cyclohexan),  $R_f$  = 0.34.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.44 (dd,  $J$  = 17.3, 1.4 Hz, 1H), 6.14 (dd,  $J$  = 17.3, 10.4 Hz, 1H), 5.86 (dd,  $J$  = 10.4, 1.4 Hz, 1H), 5.79 (ddd,  $J$  = 17.3, 10.3, 7.4 Hz, 1H), 5.37 – 5.33 (m, 1H), 5.24 (dd,  $J$  = 10.3, 0.6 Hz, 1H), 5.11 (ddd,  $J$  = 11.3, 6.5, 5.2 Hz, 1H), 3.97 (t,  $J$  = 7.9 Hz, 1H), 3.67 – 3.58 (m, 3H), 1.72 (q,  $J$  = 6.4 Hz, 2H), 1.61 – 1.42 (m, 4H), 1.40 (d,  $J$  = 4.6 Hz, 6H), 1.38 – 1.32 (m, 4H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  165.5, 135.5, 131.3, 128.2, 118.8, 108.5, 82.7, 80.6, 72.9, 45.6, 31.7, 31.4, 29.4, 27.3, 26.9, 25.9, 24.9.



## Experimenteller Teil

### 5.3.2 Synthese des 14-3-3 PPI Inhibitors 47

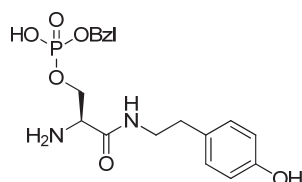
#### Fmoc-Ser(PO(OBzl)OH)-Tyramin (**43**)



Zu einer Lösung von Fmoc-Ser(PO(OBzl)OH)-OH (**42**, 150 mg, 0.3 mmol) in DCM (3 mL) wurden PyBOP (1.2 eq, 190 mg, 0.36 mmol), HOBt (1.5 eq, 60 mg, 0.45 mmol) und DIPEA (1.0 eq, 51  $\mu$ L) hinzugegeben und die entstandene Mischung für 5 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde eine Lösung aus Tyramin (1.0 eq, 42 mg, 0.3 mmol) und DIPEA (1.0 eq, 51  $\mu$ L) in DCM (3 mL) und DMF (1 mL) langsam hinzugegeben. Nach dem Rühren des Reaktionsgemisches über Nacht bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel entfernt und Fmoc-Ser(PO(OBzl)OH)-Tyramin (**43**, 135 mg, 0.22 mmol, 72 %) nach säulenchromatographischer Reinigung über C18-Silica nach Gradientenelution (15 % MeCN in H<sub>2</sub>O  $\rightarrow$  30 % MeCN in H<sub>2</sub>O  $\rightarrow$  80 % MeCN in H<sub>2</sub>O) als weißer Feststoff erhalten.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO)  $\delta$  9.18 (s, 1H), 7.88 (d,  $J$  = 7.5 Hz, 2H), 7.73 (s, 2H), 7.45 – 7.20 (m, 11H), 6.96 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 2H), 6.65 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 2H), 4.77 (s, 2H), 4.25 – 4.09 (m, 4H), 3.91 (s, 2H), 3.20 (s, 2H), 2.57 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 2H). HRMS: berechnet für C<sub>33</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>P 615.1891, gefunden  $m/z$  = 615.1909 [M-H]<sup>-</sup>; berechnet für C<sub>33</sub>H<sub>33</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>8</sub>P 639.1867, gefunden  $m/z$  = 639.1852 [M+Na]<sup>+</sup>.

#### H-Ser(PO(OBzl)OH)-Tyramin (**100**)



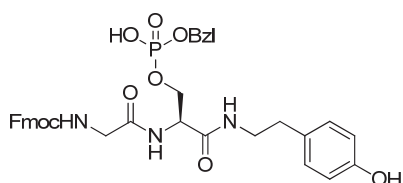
Fmoc-Ser(PO(OBzl)OH)-Tyramin (**43**, 135 mg, 0.22 mmol) wurde in MeCN/DMF (9:1, 4.5 mL) gelöst und Diethylamin (280  $\mu$ L) hinzugegeben. Nach dem Rühren für 2 Stunden bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand

## Experimenteller Teil

in 10 % MeCN in H<sub>2</sub>O (30 mL) aufgenommen. Die MeCN/H<sub>2</sub>O-Phase wurde dreimal mit Heptan (10 mL) gewaschen und anschließend das MeCN/H<sub>2</sub>O-Gemisch entfernt, so dass H-Ser(PO(OBzl)OH)-Tyramin (**100**, 87 mg, 0.22 mmol, > 98%) nach dem Trocknen im Hochvakuum als blass roter, glasiger Feststoff erhalten wurde.

LC-MS (ESI):  $t_R$  4.50 min,  $m/z$  395.52 [M+H]<sup>+</sup>, 394.13 berechnet für C<sub>18</sub>H<sub>23</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>P.

### Fmoc-Gly-Ser(PO(OBzl)OH)-Tyramin (**44**)

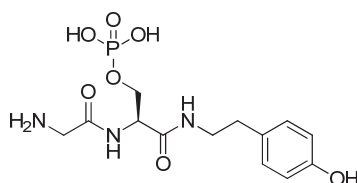


Zu einer Lösung von Fmoc-Gly-OH (1.0 eq, 65 mg, 0.22 mmol) in DCM (3 mL) und DMF (1 mL) wurden PyBOP (1.2 eq, 140 mg, 0.26 mmol), HOBt (1.5 eq, 44 mg, 0.33 mmol) und DIPEA (1.35 eq, 50  $\mu$ L) gegeben und die entstandene Mischung für 5 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde eine Lösung aus H-Ser(PO(OBzl)OH)-Tyramin (**100**, 1.0 eq, 87 mg, 0.22 mmol) und DIPEA (1.35 eq, 50  $\mu$ L) in DCM (3 mL) und DMF (1 mL) langsam hinzugegeben. Nach dem Rühren des Reaktionsgemisches über Nacht bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel entfernt und Fmoc-Ser(PO(OBzl)OH)-Tyramin (**44**, 126 mg, 0.19 mmol, 85 %) nach säulenchromatographischer Reinigung über C18 nach Gradientenelution (10 % MeCN in H<sub>2</sub>O → 20 % MeCN in H<sub>2</sub>O → 30 % MeCN in H<sub>2</sub>O → 80 % MeCN in H<sub>2</sub>O) als beiger Feststoff erhalten.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO)  $\delta$  8.02 (s, 1H), 7.84 (d,  $J$  = 7.5 Hz, 2H), 7.66 (d,  $J$  = 7.4 Hz, 2H), 7.58 (t,  $J$  = 5.6 Hz, 1H), 7.37 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 2H), 7.33 – 7.23 (m, 6H), 7.20 (d,  $J$  = 7.0 Hz, 1H), 6.90 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 2H), 6.62 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2H), 4.73 (d,  $J$  = 4.8 Hz, 2H), 4.21 (dd,  $J$  = 13.2, 5.7 Hz, 3H), 3.90 (s, 2H), 3.75 – 3.57 (m, 2H), 3.13 (d,  $J$  = 5.1 Hz, 2H), 2.52 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 2H). HRMS: berechnet für C<sub>35</sub>H<sub>36</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub>PNa 696.2081, gefunden  $m/z$  = 696.2071 [M+Na]<sup>+</sup>.

## Experimenteller Teil

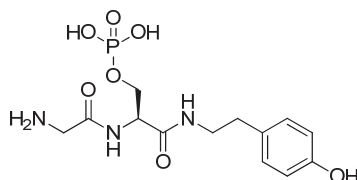
### *H-Gly-Ser(PO(OBzl)OH)-Tyramin (101)*



Fmoc-Gly-Ser(PO(OBzl)OH)-Tyramin (**44**, 10.0 mg, 0.015 mmol) wurde in MeCN/DMF (9:1, 1 mL) gelöst und Diethylamin (14  $\mu$ L) hinzugegeben. Nach dem Rühren für 2 Stunden bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand in 10 % MeCN in H<sub>2</sub>O (15 mL) aufgenommen. Die MeCN/H<sub>2</sub>O-Phase wurde zweimal mit Heptan (5 mL) gewaschen und anschließend das MeCN/H<sub>2</sub>O-Gemisch entfernt. Nach dem Trocknen im Hochvakuum erhielt man H-Gly-Ser(PO(OBzl)OH)-Tyramin (**101**, 6.8 mg, 0.015 mmol, > 98%) als blass roten, glasigen Feststoff, welcher direkt zu H-Gly-Ser(PO(OH)<sub>2</sub>)-Tyramin (**102**) umgesetzt wurde.

LC-MS (ESI):  $t_R$  4.40 min,  $m/z$  452.40 [M+H]<sup>+</sup>, 451.15 berechnet für C<sub>20</sub>H<sub>26</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>P.

### *H-Gly-Ser(PO(OH)<sub>2</sub>)-Tyramin (102)*

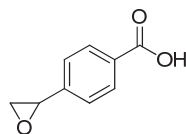


H-Gly-Ser(PO(OBzl)OH)-Tyramin (**101**, 6.8 mg, 0.015 mmol) wurde bei 0 °C mit TFA (2 mL) versetzt und anschließend für 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem Entfernen der Trifluoroessigsäure im Vakuum wurde H-Gly-Ser(PO(OH)<sub>2</sub>)-Tyramin (**102**, 0.015 mmol, < 98 %) als beiger, glasiger Feststoff erhalten, welcher direkt mit 4-(Oxiran-2-yl)benzoesäure (**46**) zu 4-(Oxiran-2-yl)benzoyl-Gly-Ser(PO(OH)<sub>2</sub>)-Tyramin (**40**) umgesetzt wurde.

LC-MS (ESI):  $t_R$  1.64 min,  $m/z$  723.20 [2M+H]<sup>+</sup>, 722.22 berechnet für C<sub>26</sub>H<sub>40</sub>N<sub>6</sub>O<sub>14</sub>P<sub>2</sub>.

## Experimenteller Teil

### 4-(Oxiran-2-yl)benzoesäure (**46**)

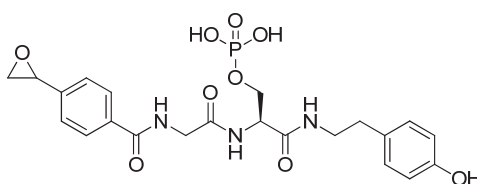


*Darstellung der Pufferlösung:* Zu einer 0.2 M NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (17 mL, pH 8.0) wurde bei 0 °C 30 % wässrige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung (1.1 mL) hinzugefügt.

*Darstellung von **46**:* MnSO<sub>4</sub> (0.1 eq, 16.7 mg, 0.1 mmol) und 4-Vinylbenzoesäure (**45**, 1.0 eq, 148 mg, 1 mmol) wurden in <sup>t</sup>BuOH (23 mL) gelöst und im raumtemperierten Wasserbad die Pufferlösung (18.1 mL) über 10 Minuten hinzugefügt. Nach dem Rühren für 90 Minuten bei Raumtemperatur wurde die nunmehr beige, trübe Lösung mit 1M HCl auf pH 4.0 gebracht, fünfmal mit DCM (20 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel entfernt, so dass 4-(Oxiran-2-yl)benzoesäure (**46**, 146 mg, 0.89 mmol, 89 %) als weißer Feststoff erhalten wurde.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.09 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.39 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 3.93 (dd, *J* = 4.0, 2.6 Hz, 1H), 3.21 (dd, *J* = 5.5, 4.1 Hz, 1H), 2.80 (dd, *J* = 5.5, 2.5 Hz, 1H).  
<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 171.1, 143.9, 130.5, 129.1, 125.5, 51.9, 51.5.

### 4-(Oxiran-2-yl)benzoyl-Gly-Ser(PO(OH)<sub>2</sub>)-Tyramin (**40**)



Zu einer Lösung von 4-(Oxiran-2-yl)benzoesäure (**46**, 2.0 eq, 3.0 mg, 0.018 mmol) in DCM (1 mL) und DMF (0.5 mL) wurden PyBOP (1.2 eq, 9.5 mg, 0.018 mmol), HOBt (1.5 eq, 3.0 mg, 0.023 mmol) und DIPEA (2.0 eq, 6 µL) hinzugefügt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde eine Lösung aus H-Gly-Ser(PO(OH)<sub>2</sub>)-Tyramin (**102**, 1.0 eq, 0.015 mmol) und DIPEA (2 eq, 6 µL) in DCM (1 mL) und DMF (0.5 mL) langsam hinzugegeben. Nach dem Rühren des Reaktionsgemisches über Nacht bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel entfernt und 4-(Oxiran-2-yl)benzoyl-Gly-Ser(PO(OH)<sub>2</sub>)-Tyramin (**40**, 4.1 mg,

## Experimenteller Teil

---

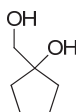
0.008 mmol, 53 %) nach säulenchromatographischer Reinigung über eine C18-Silicagelsäule nach Gradientenelution (5 % MeCN in H<sub>2</sub>O → 10 % MeCN in H<sub>2</sub>O → 15 % MeCN in H<sub>2</sub>O → 20 % MeCN in H<sub>2</sub>O) als glasiger, klarer Feststoff erhalten.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.98 (s, 1H), 7.93 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.37 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 6.97 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 6.66 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 4.24 (s, 1H), 4.01 – 3.97 (m, 1H), 3.92 (s, 3H), 3.45 – 3.42 (m, 2H), 3.18 – 3.13 (m, 3H), 2.87 (dd, *J* = 5.3, 2.5 Hz, 1H), 2.57 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H). HRMS: berechnet für C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>9</sub>P 530.1299, gefunden *m/z* = 530.1235 [M+Na]<sup>+</sup>.

## Experimenteller Teil

### 5.3.3 Synthese der Fusicoccin-Derivate als Modulatoren der 14-3-3/C-RAF PPI

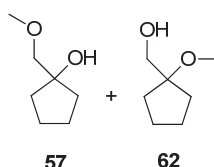
#### 1-(Hydroxymethyl)cyclopentanol (**61**)



Methylencyclopentanol (**69**, 1.0 eq, 780 mg, 1 mL, 9.5 mmol) wurde bei 0 °C zu einer Lösung von N-Methylmorphin-N-oxid (2.0 eq, 2229 mg, 19 mmol) und Osmiumtetroxid (0.05 eq, 0.48 mmol, 124 mg) in <sup>t</sup>BuOH/H<sub>2</sub>O (1:1, 75 mL) hinzugegeben und die Reaktionsmischung langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Nach dem Rühren für 24 Stunden bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von gesättigter NaHSO<sub>3</sub>-Lösung (50 mL) beendet, die Reaktionsmischung für weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt, bevor H<sub>2</sub>O (30 mL) und DCM (30 mL) hinzugegeben wurden. Nach dem Extrahieren der wässrigen Phase mit dreimal DCM (50 mL) wurden die organischen Phasen vereinigt, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung mit einer Kieselgelsäule (10 % Methanol in DCM) lieferte dann 1-(Hydroxymethyl)cyclopentanol (**61**, 689 mg, 5.90 mmol, 62 %) als klares, farbloses Öl.

TLC (5 % Methanol in DCM), *R<sub>f</sub>* = 0.13. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3.54 (s, 2H), 2.30 (s, 2H), 1.87 – 1.75 (m, 2H), 1.63 (td, *J* = 7.0, 2.6 Hz, 6H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 82.8, 69.6, 36.9, 24.1.

#### 1-(Methoxymethyl)cyclopentanol (**57**) und (1-Methoxycyclopentyl)methanol (**62**)



Zu einer Lösung von 1-(Hydroxymethyl)cyclopentanol (**61**, 1.0 eq, 100 mg, 0.81 mmol) in THF (3 mL) wurde unter Argon bei 0 °C NaH (60 % in Mineralöl, 1 mmol, 40 mg) hinzugefügt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt, bevor Methyljodid (1.0 eq, 52 µL, 0.82 mmol) hinzugegeben wurde. Nach dem Rühren für 3.5 Stunden bei Raumtemperatur wurde mit gesättigter NH<sub>4</sub>Cl-Lösung (20 mL)

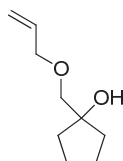
## Experimenteller Teil

gequencht. Dann wurde dreimal mit Ethylacetat (20 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (5 % Methanol in DCM) wurden 1-(Methoxymethyl)cyclopentanol (**57**, 16 mg, 0.12 mmol, 12 %) und (1-Methoxycyclopentyl)methanol (**62**, 30 mg, 0.23 mmol, 27 %) als klare, farblose Öle isoliert.

**57**: TLC (5 % Methanol in DCM),  $R_f = 0.55$ .  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3.41 (s, 3H), 3.34 (s, 2H), 2.11 (s, 1H), 1.86 – 1.76 (m, 2H), 1.72 – 1.54 (m, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  81.5, 79.8, 59.4, 37.2, 24.2.

**62**: TLC (5 % Methanol in DCM),  $R_f = 0.75$ .  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3.39 (d,  $J = 5.5$  Hz, 3H), 3.24 (s, 2H), 1.80 – 1.71 (m, 2H), 1.56 (dd,  $J = 9.9, 6.3$  Hz, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  86.60, 76.00, 50.65, 33.62, 24.59.

### 1-((Allyloxy)methyl)cyclopentanol (**58**)

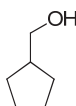


Zu einer Lösung von 1-(Hydroxymethyl)cyclopentanol (**61**, 1.0 eq, 100 mg, 0.86 mmol) in THF (3 mL) wurde unter Argon bei 0 °C NaH (60 % in Mineralöl, 2.3 eq, 2.00 mmol, 80 mg) hinzugefügt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt, bevor Allylbromid (0.9 eq, 70  $\mu\text{L}$ , 0.80 mmol) hinzugegeben wurde. Nach dem Rühren für 26 Stunden bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von gesättigter  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lösung (20 mL) gestoppt. Nach dem Extrahieren der Reaktionsmischung mit Ethylacetat (4×20 mL) wurden die vereinigten organischen Phasen über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (5 % Methanol in DCM) wurde 1-((Allyloxy)methyl)cyclopentanol (**58**, 59 mg, 0.38 mmol, 48 %) als klares, farbloses Öl erhalten.

TLC (5 % Methanol in DCM),  $R_f = 0.69$ .  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.98 – 5.82 (m, 1H), 5.27 (ddd,  $J = 17.2, 2.7, 1.7$  Hz, 1H), 5.20 – 5.12 (m, 1H), 4.05 – 3.97 (m, 2H), 3.38 (d,  $J = 1.0$  Hz, 2H), 2.19 (s, 1H), 1.84 – 1.75 (m, 2H), 1.70 – 1.53 (m, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  134.7, 116.9, 81.5, 77.1, 72.4, 37.3, 24.2.

## Experimenteller Teil

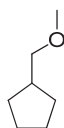
### Cyclopentylmethanol (**63**)



Zu Methylencyclopentan (**69**, 1.0 eq, 390 mg, 0.5 mL, 4.75 mmol) in THF (5 mL) wurde bei 0 °C unter Argon  $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$  (1M-Lösung in THF, 1.3 eq, 6.2 mmol, 6.2 mL) hinzugefügt und das Reaktionsgemisch langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Nach 24 Stunden Rühren bei Raumtemperatur wurde erneut auf 0 °C abgekühlt, 1M NaOH-Lösung (1.5 eq, 7.10 mmol, 7.1 mL) und  $\text{H}_2\text{O}_2$  (35%ige Lösung in  $\text{H}_2\text{O}$ , 6 mL) hinzugefügt und das Reaktionsgemisch dann für 20 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde erneut auf 0 °C abgekühlt, bevor die Reaktionslösung abschließend mit  $\text{H}_2\text{O}$  (6 mL) verdünnt wurde. Die Reaktionsmischung wurde dreimal mit Ethylacetat (20 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet, das Lösungsmittel entfernt und das Produkt säulenchromatographisch gereinigt (5 % Methanol in DCM), so dass Cyclopentylmethanol (**63**, 234 mg, 2.34 mmol, 49 %) als klares, farbloses Öl erhalten wurde.

TLC (5 % Methanol in DCM),  $R_f = 0.38$ .  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3.51 (d,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 2.16 – 2.03 (m, 1H), 1.79 – 1.70 (m, 2H), 1.58 (qdd,  $J = 10.8, 6.6, 3.8$  Hz, 4H), 1.45 (s, 1H), 1.29 – 1.20 (m, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  67.4, 42.2, 29.1, 25.4.

### (Methoxymethyl)cyclopentan (**56**)



Zu einer Lösung von Cyclopentylmethanol (**63**, 1.0 eq, 100 mg, 1 mmol) in THF (3 mL) wurde unter Argon bei 0 °C NaH (60 % in Mineralöl, 1.5 eq, 1.5 mmol, 60 mg) hinzugefügt. Die entstandene Reaktionsmischung wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt, Methyljodid (3.0 eq, 190  $\mu\text{L}$ , 3 mmol) wurde hinzugegeben und die Reaktionsmischung für weitere für 4 Stunden bei 40 °C gerührt. Gesättigte  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lösung (20 mL) wurde zugegeben, die entstandene Reaktionsmischung dreimal mit Diethylether (20 mL) extrahiert, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das



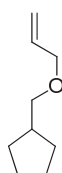
## Experimenteller Teil

---

Lösungsmittel zur Trockne eingedampft. Nach säulenchromatographischer Reinigung (2 % Diethylether in DCM) des Rückstandes wurde Methoxymethylcyclopentan (**56**, 19.4 mg, 0.17 mmol, 32 %) als klares, farbloses und leicht flüchtiges Öl isoliert.

TLC (2 % Diethylether in DCM),  $R_f = 0.90$ .  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3.33 (s, 3H), 3.25 (dd,  $J = 7.1, 1.6$  Hz, 2H), 2.16 (dd,  $J = 15.2, 7.7$  Hz, 1H), 1.72 (s, 2H), 1.63 – 1.47 (m, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  77.7, 58.7, 39.4, 29.5, 25.4.

### *((Allyloxy)methyl)cyclopentan (**59**)*



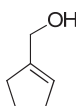
Zu einer Lösung von Cyclopentylmethanol (**63**, 1.0 eq, 110 mg, 1.1 mmol) in THF (6 mL) wurde unter Argon bei 0 °C NaH (60 % in Mineralöl, 1.5 eq, 1.65 mmol, 66 mg) hinzugefügt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde Allylbromid (3.0 eq, 290  $\mu\text{L}$ , 3.3 mmol) hinzugegeben und für 12 Stunden bei 50 °C gerührt. Gesättigte  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lösung (20 mL) wurde zugegeben, die entstandene Reaktionsmischung viermal mit Diethylether (20 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (2 % Diethylether in DCM) des Rückstandes wurde ((Allyloxy)methyl)cyclopentan (**59**, 97 mg, 0.69 mmol, 63 %) als klares, farbloses Öl erhalten.

TLC (2 % Diethylether in DCM),  $R_f = 0.92$ .  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.92 (ddt,  $J = 17.2, 10.4, 5.6$  Hz, 1H), 5.32 – 5.22 (m, 1H), 5.16 (ddt,  $J = 10.4, 1.9, 1.3$  Hz, 1H), 3.99 – 3.94 (m, 2H), 3.30 (d,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 2.22 – 2.10 (m, 1H), 1.81 – 1.69 (m, 2H), 1.62 – 1.50 (m, 4H), 1.27 (m, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  135.2, 116.6, 75.0, 71.9, 39.5, 29.6, 25.4.

## Experimenteller Teil

---

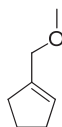
### Cyclopent-1-en-1-ylmethanol (**66**)



Zu einer -78 °C kalten Lösung von DIBAL-H (1M in Hexan, 2.3 eq, 36 mL, 36 mmol) in DCM (40 mL) wurde unter Argon Methyl-1-cyclopenten-1-carboxylat (**68**, 1.0 eq, 1986 mg, 2 mL, 15.75 mmol) hinzugefügt und für 90 Minuten bei -78 °C gerührt. Anschließend erfolgte die Zugabe von Methanol (20 mL) und 15 wt% NaOH (40 mL). Die entstandene Lösung wurde unter Erwärmen auf Raumtemperatur für 30 Minuten gerührt, die wässrige Phase dreimal mit DCM (50 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch über Silicagel (5 % Methanol in DCM) gereinigt, so das Cyclopent-1-en-1-ylmethanol (**66**, 1302 mg, 13.26 mmol, 84%) als klares, farbloses Öl erhalten wurde.

TLC (33 % Ethylacetat in Cyclohexan),  $R_f$  = 0.42. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  5.61 (dq,  $J$  = 3.8, 1.7 Hz, 1H), 4.21 – 4.17 (m, 2H), 2.40 – 2.28 (m, 4H), 1.96 – 1.86 (m, 2H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  144.2, 125.5, 62.2, 32.5, 32.3, 23.4.

### 1-(Methoxymethyl)cyclopent-1-en (**67**)

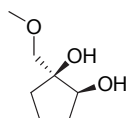


Zu einer Lösung von Cyclopent-1-en-1-ylmethanol (**66**, 1.0 eq, 300 mg, 3.06 mmol) in THF (5 mL) wurde unter Argon bei 0 °C NaH (60 % in Mineralöl, 1.5 eq, 34.00 mmol, 1360 mg) hinzugefügt und die entstandene Mischung für 45 Minuten bei Raumtemperatur gerührt, bevor Methyljodid (3.0 eq, 4.36 mL, 68.00 mmol) hinzugegeben wurde. Nach dem Rühren für 12 Stunden bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von gesättigter NH<sub>4</sub>Cl-Lösung (20 mL) gestoppt, die wässrige Phase wurde dreimal mit Diethylether (30 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (100 % DCM) des Rückstandes wurde 1-(Methoxymethyl)cyclopent-1-en (**67**, 326 mg, 2.58 mmol, 84 %) als klares, farbloses Öl erhalten.

## Experimenteller Teil

TLC (100 % DCM),  $R_f = 0.90$ .  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.65 – 5.61 (m, 1H), 3.96 (d,  $J = 0.9$  Hz, 2H), 3.32 (d,  $J = 2.6$  Hz, 3H), 2.37 – 2.27 (m, 4H), 1.94 – 1.82 (m, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  141.4, 127.6, 71.5, 58.0, 32.9, 32.4, 23.4.

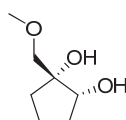
### (1*S*,2*S*)-1-(Methoxymethyl)cyclopentan-1,2-diol (**53**)



Zu einer Lösung von AD-Mix  $\alpha$  (5 g) in  $t\text{BuOH}/\text{H}_2\text{O}$  (1:1, 35 mL) wurde innerhalb von 5 Minuten 1-(Methoxymethyl)cyclopent-1-en (**67**, 400 mg, 3.57 mmol) bei 0 °C hinzuge tropft und die Lösung über Nacht bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde langsam  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  (10 g) in kleinen Portionen hinzugefügt und das Reaktionsgemisch unter Erwärmen auf Raumtemperatur für eine weitere Stunde gerührt. Das Gemisch wurde dreimal mit DCM (50 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Nach einer säulenchromatographischen Reinigung (10 % Methanol in DCM) des Rückstandes wurde dann (1*S*,2*S*)-1-(Methoxymethyl)cyclopentan-1,2-diol (**53**, 459 mg, 3.14 mmol, 88 %) als gelbes, klares Öl erhalten.

TLC (10 % Methanol in DCM),  $R_f = 0.48$ .  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3.95 (t,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 3.46 (d,  $J = 9.2$  Hz, 1H), 3.39 (s, 3H), 3.36 (d,  $J = 9.2$  Hz, 1H), 2.47 (s, 2H), 1.99 – 1.89 (m, 1H), 1.87 – 1.65 (m, 3H), 1.62 – 1.44 (m, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  79.1, 78.7, 76.6, 59.5, 33.4, 31.3, 19.3.

### (1*R*,2*R*)-1-(Methoxymethyl)cyclopentan-1,2-diol (**54**)



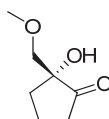
Zu einer Lösung von AD-Mix  $\beta$  (2.5 g) in  $t\text{BuOH}/\text{H}_2\text{O}$  (1:1, 16 mL) wurde 1-(Methoxymethyl)cyclopent-1-en (**67**, 200 mg, 1.78 mmol) über 5 Minuten bei 0 °C hinzuge tropft und die Lösung über Nacht bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde langsam  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  (4.8 g) in kleinen Portionen hinzugefügt und das Reaktionsgemisch unter Erwärmung auf Raumtemperatur für eine weitere Stunde

## Experimenteller Teil

gerührt. Das Gemisch wurde dann dreimal mit DCM (50 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Nach einer säulenchromatographischen Reinigung (10 % Methanol in DCM) des Rückstandes wurde dann (1*R*,2*R*)-1-(Methoxymethyl)cyclopentan-1,2-diol (**54**, 190 mg, 1.30 mmol, 73 %) als gelbes, klares Öl erhalten.

TLC (10 % Methanol in DCM),  $R_f = 0.52$ .  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3.98 – 3.92 (m, 1H), 3.45 (d,  $J = 9.2$  Hz, 1H), 3.39 (s, 3H), 3.36 (d,  $J = 9.2$  Hz, 1H), 2.60 (s, 2H), 1.99 – 1.89 (m, 1H), 1.88 – 1.67 (m, 3H), 1.51 (m, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  79.1, 78.7, 76.6, 59.5, 33.4, 31.3, 19.3.

### (*R*)-2-Hydroxy-2-(methoxymethyl)cyclopentanon (**52**)

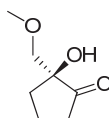


Zu einer Lösung von Oxalylchlorid (1.5 eq, 200  $\mu\text{L}$ , 1.58 mmol) in DCM (6 mL) wurde bei  $-78^\circ\text{C}$  unter Argon DMSO (3.0 eq, 213  $\mu\text{L}$ , 3.09 mmol) in DCM (2 mL) hinzugegt. Nach 30 Minuten Rühren bei  $-78^\circ\text{C}$  wurde (1*R*,2*R*)-1-(Methoxymethyl)cyclopentane-1,2-diol (**54**, 1.0 eq, 150 mg, 1.03 mmol) in DCM (2 mL) über 2 Minuten hinzugegeben. Nach dem Rühren für 4 Stunden bei  $-78^\circ\text{C}$  wurde Triethylamin (4.0 eq, 580  $\mu\text{L}$ , 4.12 mmol) langsam hinzugegeben und das Reaktionsgemisch unter Erwärmen auf Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden  $\text{H}_2\text{O}$  (8 mL) und DCM (70 mL) hinzugegeben. Die organische Phase wurde abgetrennt und jeweils einmal mit  $\text{H}_2\text{O}$  und gesättigter NaCl-Lösung (je 25 mL) gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung des Rückstandes über Silicagel (5 % Methanol in DCM) wurde dann (*R*)-2-Hydroxy-2-(methoxymethyl)cyclopentanon (**52**, 72 mg, 0.49 mmol, 48 %) als gelbes, klares Öl erhalten.

TLC (5 % Methanol in DCM),  $R_f = 0.37$ .  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3.47 – 3.38 (m, 2H), 3.36 (s, 3H), 2.83 – 2.50 (m, 1H), 2.39 – 2.29 (m, 2H), 2.22 – 2.12 (m, 1H), 2.05 – 1.82 (m, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  218.1, 109.8, 75.2, 59.7, 35.4, 33.1, 17.2.

## Experimenteller Teil

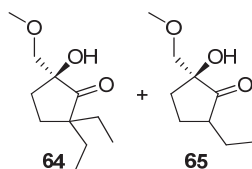
### *(S)*-2-Hydroxy-2-(methoxymethyl)cyclopentanon (**55**)



Zu einer Lösung von Oxalylchlorid (1.5 eq, 311  $\mu$ L, 3.44 mmol) in DCM (15 mL) wurde bei -78 °C unter Argon DMSO (3.0 eq, 466  $\mu$ L, 6.75 mmol) in DCM (5 mL) hinzutropft. Nach 30 Minuten Rühren bei -78 °C wurde dann innerhalb von 2 Minuten (1*S*,2*S*)-1-(Methoxymethyl)cyclopentan-1,2-diol (**53**, 1.0 eq, 328 mg, 2.25 mmol) in DCM (5 mL) hinzugegeben. Nach 18 Stunden Rühren bei -78 °C wurde das Gemisch auf -60 °C erwärmt, Triethylamin (4.0 eq, 1.27 mL, 9.00 mmol) langsam hinzugefügt und das Reaktionsgemisch anschließend für weitere 30 Minuten unter Erwärmen auf Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden H<sub>2</sub>O (15 mL) und DCM (150 mL) hinzugegeben. Die organische Phase wurde abgetrennt, jeweils einmal mit H<sub>2</sub>O und gesättigter NaCl-Lösung (je 25 mL) gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung über Silicagel (5 % Methanol in DCM) wurde dann (*R*)-2-Hydroxy-2-(methoxymethyl)cyclopentanon (**55**, 175 mg, 1.21 mmol, 54 %) als gelbes, klares Öl erhalten.

TLC (5 % Methanol in DCM),  $R_f$  = 0.38. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  3.47 – 3.39 (m, 2H), 3.36 (s, 3H), 2.39 – 2.33 (m, 2H), 2.20 – 2.14 (m, 1H), 2.03 – 1.84 (m, 3H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  218.1, 109.8, 75.2, 59.7, 35.4, 33.1, 17.2.

### *(S)*-2,2-Diethyl-5-hydroxy-5-(methoxymethyl)cyclopentanon (**64**) und (*2S*)-5-Ethyl-2-hydroxy-2-(methoxymethyl)cyclopentanon (**65**)



Zu einer Lösung von (*R*)-2-Hydroxy-2-(methoxymethyl)cyclopentanon (**55**, 1.0 eq, 150 mg, 1.04 mmol) in THF (5 mL) wurde bei 0 °C unter Argon NaH (60 % in Mineralöl, 1.5 eq, 34.00 mmol, 1360 mg) hinzugegeben und für 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt, bevor Ethyliodid (1.1 eq, 93  $\mu$ L, 1.14 mmol) hinzugegeben

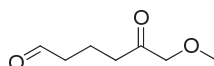
## Experimenteller Teil

wurde. Nach dem Rühren für 18 Stunden bei Raumtemperatur wurde mit gesättigter  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lösung (10 mL) gequenchet. Nach dem dreimaligen Extrahieren mit Diethylether (20 mL) wurden die vereinigten organischen Phasen über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Eine säulenchromatographische Reinigung des Rückstandes mittels Gradientenelution (2 %  $\rightarrow$  5 % Methanol in DCM) lieferte (S)-2,2-Diethyl-5-hydroxy-5-(methoxymethyl)cyclopentanon (**65**, 99.8 mg, 0.58 mmol, 56 %) und (2S)-5-Ethyl-2-hydroxy-2-(methoxymethyl)cyclopentanon (**64**, 29.2 mg, 0.15 mmol, 14 %) als klares, farbloses Öl.

**64**: TLC (33 % Ethylacetat in Cyclohexan),  $R_f = 0.45$ .  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3.40 (d,  $J = 0.7$  Hz, 2H), 3.35 (s, 3H), 2.14 – 2.09 (m, 1H), 1.90 – 1.82 (m, 2H), 1.75 – 1.69 (m, 1H), 1.58 – 1.45 (m, 4H), 0.87 – 0.79 (m, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  221.7, 79.2, 75.5, 59.8, 51.9, 30.6, 28.7, 28.3, 27.8, 8.8, 8.6.

**65**: TLC (33 % Ethylacetat in Cyclohexan),  $R_f = 0.34$ .  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3.37 (d,  $J = 0.8$  Hz, 2H), 3.35 (s, 3H), 2.25 – 2.11 (m, 4H), 1.92 – 1.75 (m, 3H), 0.95 (dd,  $J = 8.6, 6.3$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  219.7, 75.2, 59.7, 48.2, 31.9, 30.1, 23.8, 23.5, 11.7.

### 6-Methoxy-5-oxohexanal (**60**)



(1S,2S)-1-(Methoxymethyl)cyclopentan-1,2-diol (**53**, 1.0 eq, 409 mg, 2.8 mmol) wurde in DCM (10 mL) gelöst und unter Argon wurde Dess-Martin-Periodinan (1.1 eq, 1280 mg, 3.05 mmol) hinzugegeben. Nach 3 Stunden Rühren bei Raumtemperatur wurde gesättigter  $\text{K}_2\text{CO}_3$ -Lösung (20 mL) hinzugegeben, die wässrige Phase dreimal mit Ethylacetat (25 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (5 % Methanol in DCM) des Rückstandes wurde dann 6-Methoxy-5-oxohexanal (**60**, 185 mg, 1.29 mmol, 46 %) als klares, farbloses Öl erhalten.

TLC (5 % Methanol in DCM),  $R_f = 0.38$ .  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.76 (t,  $J = 1.4$  Hz, 1H), 3.98 (s, 2H), 3.41 (s, 3H), 2.55 – 2.48 (m, 4H), 1.96 – 1.88 (m, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  207.9, 201.7, 77.6, 59.3, 42.9, 37.5, 15.5.

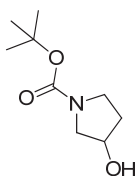
## Experimenteller Teil

### 5.3.4 Synthese der 14-3-3 - MLF1 stabilisierenden Fragmente

#### Allgemeine Arbeitsmethode A zur Boc-Entschützung:

Eine Lösung des Boc-Amins (1 mmol) wurde unter einer Argonatmosphäre in 4M HCl/Dioxan (7.5 mL) für 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt und das Amin nach dem Trocknen im Hochvakuum als entsprechendes Hydrochlorid ohne weitere Aufarbeitung erhalten.

#### *tert*-Butyl-3-hydroxypyrrolidin-1-carboxylat (**69**)



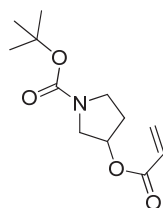
Pyrrolidinol (**78**, 1.0 eq, 500 mg, 5.74 mmol) wurde in DCM (5 mL) gelöst, Triethylamin (2.0 eq, 1.62 mL, 11.64 mmol) wurde hinzugegeben und die Lösung auf 0 °C abgekühlt. Nach der Zugabe von Di-*tert*-butyldicarbonat (1.2 eq, 1540 mg, 1.62 mL, 7.0 mmol) wurde das Reaktionsgemisch unter Erwärmen auf Raumtemperatur für weitere 12 Stunden gerührt. Anschließend wurde durch Zugabe einer wässrigen Citronensäure-Lösung auf pH 3.0 angesäuert, DCM (40 mL) hinzugefügt und die organische Phase je einmal mit H<sub>2</sub>O und gesättigter NaCl-Lösung (je 15 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach einer säulenchromatographischen Reinigung des Rückstandes über Silicagel (15 % Aceton in Chloroform) wurde dann *tert*-Butyl-3-hydroxypyrrolidin-1-carboxylat (**69**, 939 mg, 5.01 mmol, 87%) als beiges, klares Öl erhalten.

TLC (33 % Ethylacetat in Cyclohexan),  $R_f$  = 0.17. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4.47 – 4.42 (m, 1H), 3.51 – 3.41 (m, 3H), 3.35 (d,  $J$  = 11.9 Hz, 1H), 2.02 – 1.94 (m, 1H), 1.92 (s, 2H), 1.45 (s, 9H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 154.7, 79.3, 70.8, 54.2, 43.7, 33.9, 28.5.

## Experimenteller Teil

---

### *tert*-Butyl-3-(acryloyloxy)pyrrolidin-1-carboxylat (**70**)



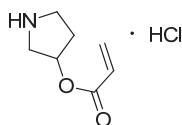
Zu einer eiskalten Lösung von *tert*-Butyl-3-hydroxypyrrolidin-1-carboxylat (**69**, 1.0 eq, 50 mg, 0.27 mmol) und DIPEA (2.2 eq, 0.1 mL, 0.59 mmol) in DCM (3 mL) wurde unter Argon bei 0 °C Acryloylchlorid (2.2 eq, 46 µL, 0.59 mmol) hinzugefügt und das Reaktionsgemisch für 4 Stunden bei dieser Temperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (5 mL) gestoppt, dreimal mit DCM (15 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Nach einer säulenchromatographischen Reinigung über Silicagel (33 % Ethylacetat in Cyclohexan) wurde *tert*-Butyl-3-(acryloyloxy)pyrrolidin-1-carboxylat (**70**, 63 mg, 0.26 mmol, 98 %) als gelbes, klares Öl erhalten.

TLC (33 % Ethylacetat in Cyclohexan),  $R_f$  = 0.64. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6.31 (dd,  $J$  = 17.3, 1.2 Hz, 1H), 6.01 – 5.91 (m, 1H), 5.80 – 5.75 (m, 1H), 3.36 (ddd,  $J$  = 11.9, 11.0, 4.1 Hz, 2H), 3.29 – 3.20 (m, 2H), 3.17 (dt,  $J$  = 4.7, 1.6 Hz, 1H), 2.22 – 2.05 (m, 2H), 1.45 (s, 9H). LC-MS (ESI):  $t_R$  9.24 min,  $m/z$  141.93 [M+H-Boc]<sup>+</sup>, 141.08 berechnet für C<sub>7</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub>.



## Experimenteller Teil

### Pyrrolidin-3-yl-acrylat Hydrochlorid (**71**)



Die Entschützung von **70** erfolgte nach der allgemeinen Methode **A**:

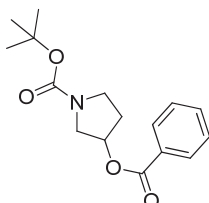
*tert*-Butyl-3-(acryloyloxy)pyrrolidin-1-carboxylat (**70**): 46 mg, 0.19 mmol

4M HCl/Dioxan: 1.5 mL

Man erhielt Pyrrolidin-3-yl-acrylat Hydrochlorid (**71**, 33 mg, 0.19 mmol, >98%) als schwach gelben Feststoff.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.31 (dd,  $J$  = 17.3, 1.2 Hz, 1H), 6.01 – 5.91 (m, 1H), 5.80 – 5.75 (m, 1H), 5.30 (d,  $J$  = 4.5 Hz, 1H), 3.36 (ddd,  $J$  = 11.9, 11.0, 4.1 Hz, 2H), 3.29 – 3.20 (m, 2H), 3.17 (dt,  $J$  = 4.7, 1.6 Hz, 1H), 2.22 – 2.05 (m, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  165.0, 132.1, 127.1, 72.5, 50.2, 43.7, 38.8.

### *tert*-Butyl-3-(benzoyloxy)pyrrolidin-1-carboxylat (**72**)

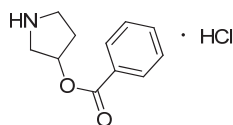


Die Darstellung von **72** erfolgte analog der Synthese von *tert*-Butyl-3-(acryloyloxy)pyrrolidin-1-carboxylat (**70**). Dazu wurde **69** (1.0 eq, 50 mg, 0.27 mmol) mit Benzoylchlorid (2.2 eq, 83 mg, 60  $\mu\text{L}$ , 0.59 mmol) und DIPEA (2.2 eq, 0.1 mL, 0.59 mmol) in DCM (3 mL) umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung über Silicagel (16 % Ethylacetat in Cyclohexan) wurde dann *tert*-Butyl-3-(benzoyloxy)pyrrolidin-1-carboxylat (**72**, 39 mg, 0.14 mmol, 51 %) als gelbes, klares Öl erhalten.

TLC (16 % Ethylacetat in Cyclohexan),  $R_f$  = 0.56.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.54 – 6.38 (m, 2H), 6.18 – 6.07 (m, 2H), 5.88 – 5.82 (m, 1H), 3.62 – 3.38 (m, 5H), 2.11 – 2.03 (m, 2H), 1.46 (s, 9H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  170.2, 154.5, 132.8, 131.4, 131.3, 128.2, 128.0, 127.9, 79.7, 74.0, 51.8, 43.7, 33.5, 28.5. LC-MS (ESI):  $t_R$  10.54 min,  $m/z$  191.93  $[\text{M}+\text{H}-\text{Boc}]^+$ , 191.09 berechnet für  $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{NO}_2$ .

## Experimenteller Teil

### *Pyrrolidin-3-yl-benzoat Hydrochlorid (73)*



Die Entschützung von **72** erfolgte nach der allgemeinen Methode **A**:

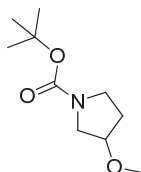
*tert*-Butyl-3-(benzoyloxy)pyrrolidin-1-carboxylat (**72**): 32 mg, 0.11 mmol

4M HCl/Dioxan: 1.0 mL

Es wurde Pyrrolidin-3-yl-benzoat Hydrochlorid (**71**, 27 mg, 0.11 mmol, >98%) als gelber Feststoff erhalten.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.54 – 6.38 (m, 2H), 6.18 – 6.07 (m, 2H), 5.88 – 5.82 (m, 1H), 3.62 – 3.38 (m, 5H), 2.11 – 2.03 (m, 2H).

### *tert*-Butyl-3-methoxypyrrolidin-1-carboxylat (**74**)

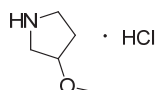


Zu einer Lösung von *tert*-Butyl-3-hydroxypyrrolidin-1-carboxylat (**69**, 1.0 eq, 50 mg, 0.27 mmol) in THF (2 mL) wurde unter Argon bei 0 °C NaH (60 % in Mineralöl, 1.5 eq, 0.40 mmol, 16 mg) hinzugefügt und für 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Methyljodid (2.0 eq, 37  $\mu\text{L}$ , 0.55 mmol) wurde hinzugegeben, die entstandene Reaktionsmischung für 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und die Reaktion dann durch Zugabe von gesättigter  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lösung (3 mL) gestoppt. Nach dreimaligem Extrahieren mit Ethylacetat (10 mL) wurden die vereinigten organischen Phasen über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Eine säulenchromatographische Reinigung (33 % Ethylacetat in Cyclohexan) des Rückstandes lieferte *tert*-Butyl-3-methoxypyrrolidin-1-carboxylat (**74**, 33 mg, 0.16 mmol, 61 %) als schwach gelbes Öl.

TLC (33 % Ethylacetat in Cyclohexan),  $R_f$  = 0.60.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3.95 - 3.90 (m, 1H), 3.43 - 3.37 (m, 3H), 3.32 (s, 3H), 2.02 - 1.94 (m, 1H), 1.93 - 1.88 (m, 1H), 1.45 (s, 9H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  154.6, 79.5, 79.2, 56.5, 50.7, 43.8, 29.7, 28.5.

## Experimenteller Teil

### 3-Methoxypyrrolidin Hydrochlorid (**75**)



Die Entschützung von **74** erfolgte nach der allgemeinen Methode **A**:

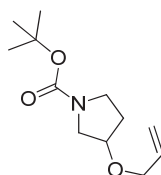
*tert*-Butyl-3-methoxypyrrolidin-1-carboxylat (**74**): 52 mg, 0.26 mmol

4M HCl/Dioxan: 1.5 mL

Es wurde 3-Methoxypyrrolidin Hydrochlorid (**75**, 35 mg, 0.26 mmol, >98%) als gelber Feststoff erhalten.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  4.12 - 4.07 (m, 1H), 3.43 - 3.37 (m, 3H), 3.32 (s, 3H), 2.02 - 1.94 (m, 1H), 1.93 - 1.88 (m, 1H).

### *tert*-Butyl-3-(allyloxy)pyrrolidin-1-carboxylat (**76**)



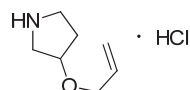
Die Darstellung von **76** erfolgte analog der Synthese von *tert*-Butyl-3-methoxypyrrolidin-1-carboxylat (**74**). Dazu wurde **69** (1.0 eq, 50 mg, 0.27 mmol) mit NaH (60 % in Mineralöl, 1.5 eq, 16 mg, 0.4 mmol) deprotoniert und mit Allylbromid (2.2 eq, 83 mg, 60  $\mu\text{L}$ , 0.59 mmol) in THF (2 mL) umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung über Silicagel (33 % Ethylacetat in Cyclohexan) wurde *tert*-Butyl-3-(allyloxy)pyrrolidin-1-carboxylat (**76**, 59 mg, 0.26 mmol, 98 %) als gelbes, klares Öl erhalten.

TLC (33 % Ethylacetat in Cyclohexan),  $R_f$  = 0.73.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.97 – 5.83 (m, 1H), 5.33 – 5.14 (m, 2H), 4.07 (dt,  $J$  = 7.7, 3.6 Hz, 1H), 3.98 (d,  $J$  = 5.5 Hz, 2H), 3.47 – 3.35 (m, 4H), 2.04 – 1.88 (m, 2H), 1.45 (s, 9H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  154.6, 134.5, 117.1, 79.2, 77.2, 69.9, 51.1, 43.8, 31.0, 28.5. LC-MS (ESI):  $t_R$  9.77 min,  $m/z$  127.93  $[\text{M}+\text{H}-\text{Boc}]^+$ , 127.10 berechnet für  $\text{C}_7\text{H}_{13}\text{NO}$ .

## Experimenteller Teil

---

### 3-(Allyloxy)pyrrolidin Hydrochlorid (**77**)



Die Entschützung von **76** erfolgte nach der allgemeinen Methode **A**:

*tert*-Butyl-3-methoxypyrrolidin-1-carboxylat (**76**): 39 mg, 0.17 mmol

4M HCl/Dioxan: 1.5 mL

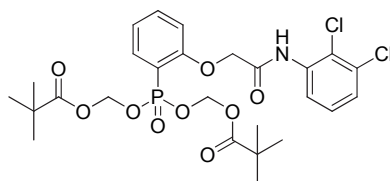
Es wurde 3-Methoxypyrrolidin Hydrochlorid (**77**, 27 mg, 0.26 mmol, >98%) als gelber Feststoff erhalten.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.93 – 5.80 (m, 1H), 5.28 (dq,  $J$  = 17.2, 1.5 Hz, 1H), 5.19 (ddd,  $J$  = 10.4, 2.6, 1.2 Hz, 1H), 4.24 (d,  $J$  = 2.4 Hz, 1H), 4.03 – 3.92 (m, 2H), 3.53 – 3.33 (m, 4H), 2.56 (s, 1H), 2.21 – 2.12 (m, 1H), 2.09 – 1.98 (m, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  133.7, 117.7, 76.3, 70.1, 49.7, 43.7, 30.9.

## Experimenteller Teil

### 5.3.5 Synthese der kovalenten, zellgängigen 14-3-3 Inhibitoren

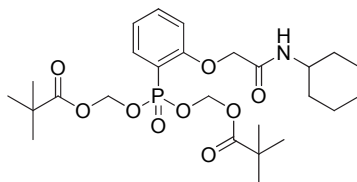
(((2-(2-((2,3-Dichlorophenyl)amino)-2-oxoethoxy)phenyl)phosphoryl)bis(oxy))-bis-(methylen)-bis(2,2-dimethylpropanoat) (**80**)



Ein Gemisch aus (2-(2-((2,3-Dichlorophenyl)amino)-2-oxoethoxy)phenyl)phosphonsäure (**79**, 1.0 eq, 8.6 mg, 0.023 mmol) und Triethylamin (2.0 eq, 8.8  $\mu$ L, 0.063 mmol) in DMF (600  $\mu$ L) wurde für 5 Minuten bei Raumtemperatur gerührt, bevor Chloromethylpivalat (10.0 eq, 41 mg, 39  $\mu$ L, 0.273 mmol) hinzugefügt wurde. Nach 16 Stunden Rühren bei 60 °C wurde das Lösungsmittel entfernt, der Rückstand in DCM (15 mL) aufgenommen, je einmal mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und H<sub>2</sub>O (je 4 mL) gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (2 % Methanol in DCM) des Rückstandes wurde (((2-(2-((2,3-Dichlorophenyl)amino)-2-oxoethoxy)phenyl)phosphoryl)bis(oxy))bis(methylen)-bis-(2,2-dimethylpropanoat) (**80**, 6.6 mg, 0.011 mmol, 48 %) als weißer Feststoff erhalten.

TLC (2 % Methanol in DCM),  $R_f$  = 0.42. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.88 (dd,  $J$  = 8.1, 1.3 Hz, 1H), 7.81 (dd,  $J$  = 15.0, 7.2 Hz, 1H), 7.60 (t,  $J$  = 7.7 Hz, 1H), 7.31 (dd,  $J$  = 8.1, 1.4 Hz, 1H), 7.23 (t,  $J$  = 8.1 Hz, 1H), 7.14 (td,  $J$  = 7.5, 3.3 Hz, 1H), 6.99 (t,  $J$  = 7.7 Hz, 1H), 5.75 (d,  $J$  = 13.3 Hz, 4H), 4.76 (s, 2H), 1.09 (s, 18H). <sup>13</sup>C (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  176.7, 166.3, 158.9, 135.5, 135.4, 134.7, 134.7, 133.3, 127.3, 127.2, 126.0, 123.7, 122.3, 122.1, 112.8, 81.9, 81.9, 68.1, 38.6, 26.7. HRMS: berechnet für C<sub>26</sub>H<sub>33</sub>Cl<sub>2</sub>NO<sub>9</sub>P 604.1265, gefunden  $m/z$  = 604.1256 [m+H]<sup>+</sup>.

(((2-(2-(Cyclohexylamino)-2-oxoethoxy)phenyl)phosphoryl)bis(oxy))bis(methylen)-bis-(2,2-dimethylpropanoat) (**82**)



TLC (2 % Methanol in DCM),  $R_f = 0.72$ .  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.93 (d,  $J = 7.9$ , 1H), 7.72 (ddd,  $J = 15.3$ , 7.6, 1.6 Hz, 1H), 7.55 (dd,  $J = 8.2$ , 7.6 Hz, 1H), 7.07 (td,  $J = 7.5$ , 3.8 Hz, 1H), 6.89 (t,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 5.82 - 5.70 (m, 4H), 4.53 (s, 2H), 3.82 (tt,  $J = 10.6$ , 5.4 Hz, 1H), 1.96 - 1.87 (m, 2H), 1.75 (dd,  $J = 16.2$ , 6.4 Hz, 3H), 1.63 (d,  $J = 13.3$  Hz, 1H), 1.40 - 1.26 (m, 4H), 1.13 (s, 18H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  176.7, 166.3, 159.2, 135.4, 134.3, 134.2, 121.7, 121.5, 112.2, 112.1, 81.9, 81.8, 67.6, 48.3, 38.7, 32.7, 26.7, 25.4, 25.0. HRMS berechnet für  $\text{C}_{26}\text{H}_{41}\text{NO}_9\text{P}$  542.2513, gefunden  $m/z = 542.2511$   $[\text{m}+\text{H}]^+$ .

### 5.4 Aktivitätsbasierte Protein Profiling-Experimente

#### 5.4.1 Generelle Methoden

##### 5.4.1.1 Pflanzenmaterial

Die *Arabidopsis thaliana* (Ökotyp Columbia)-Pflanzen wurden im Gewächsschrank bei 24 °C (Tag) bzw. 20 °C (Nacht) unter 12-stündiger Lichtbestrahlung herangezüchtet. Für die Herstellung der Blätterextrakte wurden Blätter von ca. 4 Wochen alten Pflanzen verwendet <sup>[147]</sup>.

##### 5.4.1.2 Proteinextraktion von *Arabidopsis thaliana*-Blättern

In einem 1.5 mL Eppendorf Gefäß wurden zwei *A. thaliana*-Blätter in 100 µL H<sub>2</sub>O klein gerieben und das Volumen anschließend mit 900 µL H<sub>2</sub>O auf 1 mL Totalvolumen aufgefüllt. Der Rückstand wurde durch Zentrifugation gereinigt (1 min bei 16000 g).

##### 5.4.1.3 Labeling von *A. thaliana*-Blätterextrakten

Das *Labeling* wurde mit 450 µL Blätterextrakt durchgeführt. 25 µL Puffer (50 mM Natriumacetat für pH ≤ 6.5 und 50 mM 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol für pH ≥ 7.0) wurden hinzugefügt. Diese Lösung wurde dann mit 0.5 µL der zu testenden Probe versehen (10 mM Lösung in DMSO für 10 µM Endkonzentration) und über eine Inkubationszeit von 2 Stunden unter Lichtausschluss rotiert. Durch die Zugabe von 1 mL eiskaltem Aceton (100 %) wurden die Proteine anschließend ausgefällt, die Lösung zentrifugiert (1 min bei 16000 g), das Präzipitat in 2 x SDS-PAGE *loading-buffer* (50 µL) gelöst und anschließend für fünf Minuten bei 95 °C erhitzt. Die Proteine wurden dann über SDS-PAGE getrennt und die fluoreszenten Proben durch einen Typhoon-Scanner visualisiert.

### 6. Literaturverzeichnis

- [1] S. V. Frye, *Nat. Chem. Biol.* **2010**, 6, 159-161.
- [2] L. Burdine, T. Kodadek, *Chem. Biol.* **2004**, 11, 593-597.
- [3] G. C. Terstappen, C. Schlupen, R. Raggiaschi, G. Gaviraghi, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, 6, 891-903.
- [4] C. A. Lewis, K. E. Longcore, S. J. Miller, P. A. Wender, *J. Nat. Prod.* **2009**, 72, 1864-1869.
- [5] S. Peddibhotla, Y. Dang, J. O. Liu, D. Romo, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 12222-12231.
- [6] R. A. Shenvi, D. P. O'Malley, P. S. Baran, *Acc. Chem. Res.* **2009**, 42, 530-541.
- [7] D. J. Newman, G. M. Cragg, in *RSC Biomolecular Sciences No. 18; Natural Product Chemistry for Drug Discovery* (Eds.: A. D. Buss, M. S. Butler), Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, **2010**.
- [8] J. Clardy, C. Walsh, *Nature* **2004**, 432, 829-837.
- [9] A. Harvey, *Drug Discovery Today* **2000**, 5, 294-300.
- [10] J. W. Li, J. C. Vederas, *Science* **2009**, 325, 161-165.
- [11] D. J. Newman, G. M. Cragg, K. M. Snader, *J. Nat. Prod.* **2003**, 66, 1022-1037.
- [12] E. E. Carlson, *ACS Chem. Biol.* **2010**, 5, 639-653.
- [13] T. C. Hunter, N. L. Andon, A. Koller, J. R. Yates, P. A. Haynes, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2002**, 782, 165-181.
- [14] S. D. Patterson, R. H. Aebersold, *Nat. Genet.* **2003**, 33, 311-323.
- [15] M. Yanagida, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2002**, 771, 89-106.
- [16] M. Y. Galperin, E. V. Koonin, *Nucleic Acids Res.* **2004**, 32, 5452-5463.
- [17] B. F. Cravatt, A. T. Wright, J. W. Kozarich, *Annu. Rev. Biochem.* **2008**, 77, 383-414.
- [18] N. Jessani, B. F. Cravatt, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2004**, 8, 54-59.
- [19] H. Overkleeft, *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, 20, 552-553.
- [20] U. Rix, G. Superti-Furga, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, 5, 616-624.
- [21] A. K. Cheung, R. K. Jain, *IDrugs : the investigational drugs journal* **2010**, 13, 862-868.
- [22] F. Cong, A. K. Cheung, S. M. A. Huang, *Annu. Rev. Pharmacol.* **2012**, 52, 57-78.



## Literaturverzeichnis

---

- [23] S.-i. Sato, A. Murata, T. Shirakawa, M. Uesugi, *Chem. Biol.* **2010**, *17*, 616-623.
- [24] L. Sleno, A. Emili, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 46-54.
- [25] X. Ge, D. S. Sem, *Anal. Biochem.* **2007**, *370*, 171-179.
- [26] M. C. Hagenstein, J. H. Mussnug, K. Lotte, R. Plessow, A. Brockhinke, O. Kruse, N. Sewald, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2003**, *42*, 5635-5638.
- [27] D. A. Jeffery, M. Bogyo, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *14*, 87-95.
- [28] J. Krysiak, R. Breinbauer, *Top. Curr. Chem.* **2012**, *324*, 43-84.
- [29] A. B. Berger, P. M. Vitorino, M. Bogyo, *Am. J. Pharmacogenomics* **2004**, *4*, 371-381.
- [30] M. J. Evans, B. F. Cravatt, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3279-3301.
- [31] S. H. Verhelst, M. Bogyo, *Biotechniques* **2005**, *38*, 175-177.
- [32] D. Greenbaum, K. F. Medzihradszky, A. Burlingame, M. Bogyo, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 569-581.
- [33] N. A. Thornberry, E. P. Peterson, J. J. Zhao, A. D. Howard, P. R. Griffin, K. T. Chapman, *Biochemistry* **1994**, *33*, 3934-3940.
- [34] J. R. Betley, S. Cesaro-Tadic, A. Mekhalfia, J. H. Rickard, H. Denham, L. J. Partridge, A. Pluckthun, G. M. Blackburn, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, *41*, 775-777.
- [35] Q. Wang, U. Dechert, F. Jirik, S. G. Withers, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, *200*, 577-583.
- [36] L. C. Lo, T. L. Pang, C. H. Kuo, Y. L. Chiang, H. Y. Wang, J. J. Lin, *J. Proteome Res.* **2002**, *1*, 35-40.
- [37] C. S. Tsai, Y. K. Li, L. C. Lo, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 3607-3610.
- [38] Q. Zhu, A. Girish, S. Chattopadhyaya, S. Q. Yao, *Chem. Commun.* **2004**, 1512-1513.
- [39] Q. Zhu, X. Huang, G. Y. J. Chen, S. Q. Yao, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 2669-2672.
- [40] E. W. Chan, S. Chattopadhyaya, R. C. Panicker, X. Huang, S. Q. Yao, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14435-14446.
- [41] A. Saghatelian, N. Jessani, A. Joseph, M. Humphrey, B. F. Cravatt, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 10000-10005.
- [42] M. B. Goshe, R. D. Smith, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *14*, 101-109.

## Literaturverzeichnis

---

- [43] S. P. Gygi, B. Rist, S. A. Gerber, F. Turecek, M. H. Gelb, R. Aebersold, *Nat. Biotechnol.* **1999**, 17, 994-999.
- [44] D. Greenbaum, A. Baruch, L. Hayrapetian, Z. Darula, A. Burlingame, K. F. Medzihradszky, M. Bogyo, *Mol. Cell. Proteomics* **2002**, 1, 60-68.
- [45] D. Kidd, Y. Liu, B. F. Cravatt, *Biochemistry* **2001**, 40, 4005-4015.
- [46] G. C. Adam, B. F. Cravatt, E. J. Sorensen\*, *Chem. Biol.* **2001**, 8, 81-95.
- [47] D. C. Greenbaum, W. D. Arnold, F. Lu, L. Hayrapetian, A. Baruch, J. Krumrine, S. Toba, K. Chehade, D. Brömme, I. D. Kuntz, M. Bogyo, *Chem. Biol.* **2002**, 9, 1085-1094.
- [48] S. P. Gygi, R. Aebersold, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, 4, 489-494.
- [49] J. Rappsilber, M. Mann, *Trends Biochem. Sci.* **2002**, 27, 74-78.
- [50] M. Wilchek, E. A. Bayer, *Methods Enzymol.* **1990**, 184, 5-13.
- [51] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, 41, 2596-2599.
- [52] E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* **2000**, 287, 2007-2010.
- [53] A. E. Speers, G. C. Adam, B. F. Cravatt, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 4686-4687.
- [54] A. E. Speers, B. F. Cravatt, *Chem. Biol.* **2004**, 11, 535-546.
- [55] A. E. Speers, B. F. Cravatt, *ChemBioChem* **2004**, 5, 41-47.
- [56] E. Saxon, J. I. Armstrong, C. R. Bertozzi, *Org. Lett.* **2000**, 2, 2141-2143.
- [57] H. Ovaa, P. F. van Swieten, B. M. Kessler, M. A. Leeuwenburgh, E. Fiebiger, A. M. van den Nieuwendijk, P. J. Galardy, G. A. van der Marel, H. L. Ploegh, H. S. Overkleeft, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2003**, 42, 3626-3629.
- [58] N. Jessani, Y. Liu, M. Humphrey, B. F. Cravatt, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, 99, 10335-10340.
- [59] D. Leung, C. Hardouin, D. L. Boger, B. F. Cravatt, *Nat. Biotechnol.* **2003**, 21, 687-691.
- [60] W. Li, J. L. Blankman, B. F. Cravatt, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 9594-9595.
- [61] B. W. Moore, V. J. Perez, in *Physiological and Biochemical Aspects of Nervous Integration* (Ed.: F. D. Carlson), Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall, **1967**, pp. 343-359.
- [62] H. A. Fu, R. R. Subramanian, S. C. Masters, *Annu. Rev. Pharmacol.* **2000**, 40, 617-647.

## Literaturverzeichnis

---

- [63] T. Ichimura, T. Isobe, T. Okuyama, N. Takahashi, K. Araki, R. Kuwano, Y. Takahashi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1988**, *85*, 7084-7088.
- [64] W. J. Fantl, A. J. Muslin, A. Kikuchi, J. A. Martin, A. M. MacNicol, R. W. Gross, L. T. Williams, *Nature* **1994**, *371*, 612-614.
- [65] E. Freed, M. Symons, S. G. Macdonald, F. McCormick, R. Ruggieri, *Science* **1994**, *265*, 1713-1716.
- [66] H. Fu, K. Xia, D. C. Pallas, C. Cui, K. Conroy, R. P. Narsimhan, H. Mamon, R. J. Collier, T. M. Roberts, *Science* **1994**, *266*, 126-129.
- [67] A. Toker, C. A. Ellis, L. A. Sellers, A. Aitken, *Eur. J. Biochem.* **1990**, *191*, 421-429.
- [68] A. Aitken, D. B. Collinge, B. P. van Heusden, T. Isobe, P. H. Roseboom, G. Rosenfeld, J. Soll, *Trends Biochem. Sci.* **1992**, *17*, 498-501.
- [69] H. Hermeking, *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 931-943.
- [70] G. Tzivion, J. Avruch, *The Journal of biological chemistry* **2002**, *277*, 3061-3064.
- [71] M. J. van Hemert, H. Y. Steensma, G. P. van Heusden, *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **2001**, *23*, 936-946.
- [72] B. Pauly, *14-3-3 Bindeproteine und deren Rolle in Signaltransduktion und Vesikeltransport in Hydra*, Thesis, LMU München **2005**.
- [73] J. E. Celis, B. Gesser, H. H. Rasmussen, P. Madsen, H. Leffers, K. Dejgaard, B. Honore, E. Olsen, G. Ratz, J. B. Lauridsen, et al., *Electrophoresis* **1990**, *11*, 989-1071.
- [74] G. R. Fanger, C. Widmann, A. C. Porter, S. Sather, G. L. Johnson, R. R. Vaillancourt, *The Journal of biological chemistry* **1998**, *273*, 3476-3483.
- [75] M. Garcia-Guzman, F. Dolfi, M. Russello, K. Vuori, *The Journal of biological chemistry* **1999**, *274*, 5762-5768.
- [76] H. Leffers, P. Madsen, H. H. Rasmussen, B. Honore, A. H. Andersen, E. Walbum, J. Vandekerckhove, J. E. Celis, *J. Mol. Biol.* **1993**, *231*, 982-998.
- [77] D. Bridges, G. B. G. Moorhead, *Sci. STKE* **2004**, *2004*, re10-.
- [78] M. Rosenquist, M. Alsterfjord, C. Larsson, M. Sommarin, *Plant Physiol.* **2001**, *127*, 142-149.
- [79] H. Martin, Y. Patel, D. Jones, S. Howell, K. Robinson, A. Aitken, *FEBS Lett.* **1993**, *331*, 296-303.

## Literaturverzeichnis

---

- [80] A. Aitken, S. Howell, D. Jones, J. Madrazo, Y. Patel, *The Journal of biological chemistry* **1995**, 270, 5706-5709.
- [81] D. Liu, J. Bienkowska, C. Petosa, R. J. Collier, H. Fu, R. Liddington, *Nature* **1995**, 376, 191-194.
- [82] B. Xiao, S. J. Smerdon, D. H. Jones, G. G. Dodson, Y. Soneji, A. Aitken, S. J. Gamblin, *Nature* **1995**, 376, 188-191.
- [83] X. Yang, W. H. Lee, F. Sobott, E. Papagrigoriou, C. V. Robinson, J. G. Grossmann, M. Sundström, D. A. Doyle, J. M. Elkins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, 103, 17237-17242.
- [84] D. K. Morrison, *Trends Cell Biol.* **2009**, 19, 16-23.
- [85] M. B. Yaffe, K. Rittinger, S. Volinia, P. R. Caron, A. Aitken, H. Leffers, S. J. Gamblin, S. J. Smerdon, L. C. Cantley, *Cell* **1997**, 91, 961-971.
- [86] A. J. Muslin, J. W. Tanner, P. M. Allen, A. S. Shaw, *Cell* **1996**, 84, 889-897.
- [87] K. Rittinger, J. Budman, J. Xu, S. Volinia, L. C. Cantley, S. J. Smerdon, S. J. Gamblin, M. B. Yaffe, *Mol. Cell* **1999**, 4, 153-166.
- [88] L. Perego, G. Berruti, *Mol. Reprod. Dev.* **1997**, 47, 370-379.
- [89] V. Cotellet, S. E. Meek, F. Provan, F. C. Milne, N. Morrice, C. MacKintosh, *The EMBO journal* **2000**, 19, 2869-2876.
- [90] S. Braselmann, F. McCormick, *The EMBO journal* **1995**, 14, 4839-4848.
- [91] L. Zhang, J. Chen, H. Fu, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, 96, 8511-8515.
- [92] I. M. Nooren, J. M. Thornton, *The EMBO journal* **2003**, 22, 3486-3492.
- [93] K. Venkatesan, J. F. Rual, A. Vazquez, U. Stelzl, I. Lemmens, T. Hirozane-Kishikawa, T. Hao, M. Zenkner, X. F. Xin, K. I. Goh, M. A. Yildirim, N. Simonis, K. Heinzmann, F. Gebreab, J. M. Sahalie, S. Cevik, C. Simon, A. S. de Smet, E. Dann, A. Smolyar, A. Vinayagam, H. Y. Yu, D. Szeto, H. Borick, A. Dricot, N. Klitgord, R. R. Murray, C. Lin, M. Lalowski, J. Timm, K. Rau, C. Boone, P. Braun, M. E. Cusick, F. P. Roth, D. E. Hill, J. Tavernier, E. E. Wanker, A. L. Barabasi, M. Vidal, *Nat. Methods* **2009**, 6, 83-90.
- [94] B. C. Finzel, P. C. Weber, K. D. Hardman, F. R. Salemme, *J. Mol. Biol.* **1985**, 186, 627-643.
- [95] R. Rose, S. Erdmann, S. Bovens, A. Wolf, M. Rose, S. Hennig, H. Waldmann, C. Ottmann, *Angew. Chem.* **2010**, 122, 4223-4226.
- [96] P. Thiel, M. Kaiser, C. Ottmann, *Angew. Chem.* **2012**, 124, 2052-2059.

- [97] A. Ballio, E. B. Chain, P. De Leo, B. F. Erlanger, M. Mauri, A. Tonolo, *Nature* **1964**, 203, 297-297.
- [98] C. Oecking, C. Eckerskorn, E. W. Weiler, *FEBS Lett.* **1994**, 352, 163-166.
- [99] M. Wurtele, C. Jelich-Ottmann, A. Wittinghofer, C. Oecking, *The EMBO journal* **2003**, 22, 987-994.
- [100] C. Ottmann, S. Marco, N. Jaspert, C. Marcon, N. Schauer, M. Weyand, C. Vandermeeren, G. Duby, M. Boutry, A. Wittinghofer, J.-L. Rigaud, C. Oecking, *Molecular cell* **2007**, 25, 427-440.
- [101] C. Oecking, M. Piotrowski, J. Hagemeyer, K. Hagemann, *Plant J.* **1997**, 12, 441-453.
- [102] N. C. Turner, A. Graniti, *Nature* **1969**, 223, 1070-1071.
- [103] M. Asaoka, M. Abe, T. Mukuta, H. Takei, *Chem. Lett.* **1982**, 11, 215-218.
- [104] M. Asaoka, N. Yanagida, H. Takei, *Tetrahedron Lett.* **1980**, 21, 4611-4614.
- [105] J. E. Baldwin, R. M. Adlington, S. H. Ramcharitar, *Tetrahedron* **1992**, 48, 2957-2976.
- [106] H. J. Bestmann, R. Schobert, *Angew. Chem.* **1985**, 97, 784-785.
- [107] J. Gebauer, S. Blechert, *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 2021-2025.
- [108] Y. Kobayashi, H. Okui, *J. Org. Chem.* **1999**, 65, 612-615.
- [109] S. C. Sinha, A. Sinha-Bagchi, E. Keinan, *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 7789-7796.
- [110] B. M. Trost, S. J. Brickner, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 568-575.
- [111] H. Wu, J. Ge, S. Q. Yao, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 6528-6532.
- [112] R. Marais, Y. Light, H. F. Paterson, C. J. Marshall, *The EMBO journal* **1995**, 14, 3136-3145.
- [113] K. H. Michel, P. V. Demarco, R. Nagarajan, *J. Antibiot.* **1977**, 30, 571-575.
- [114] S. Canova, R. Lépine, A. Thys, A. Baron, D. Roche, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, 21, 4768-4772.
- [115] W.-W. Lee, H. J. Shin, S. Chang, *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, 12, 29-31.
- [116] G. Quinkert, F. Küber, W. Knauf, M. Wacker, U. Koch, H. Becker, H. P. Nestler, G. Dürner, G. Zimmermann, J. W. Bats, E. Egert, *Helv. Chim. Acta* **1991**, 74, 1853-1923.
- [117] J. M. Chong, M. A. Heuft, P. Rabbat, *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 5837-5838.
- [118] A. Ghosh, I. Chakraborty, N. N. Adarsh, S. Lahiri, *Tetrahedron* **2010**, 66, 164-171.
- [119] R. D. Rieke, *Science* **1989**, 246, 1260-1264.

## Literaturverzeichnis

---

- [120] R. D. Rieke, S. E. Bales, P. M. Hudnall, T. P. Burns, G. S. Poindexter, *Org. Synth.* **1988**, 50-9, 845-852.
- [121] G. Tzivion, V. S. Gupta, L. Kaplun, V. Balan, *Sem. Cancer Biol.* **2006**, 16, 203-213.
- [122] Y. Fujii, A. Fukuda, T. Hamasaki, I. Ichimoto, H. Nakajima, *Phytochemistry* **1995**, 40, 1443-1446.
- [123] A. Hirota, H. Sakai, A. Isogai, *Agric. Biol. Chem.* **1985**, 49, 731-735.
- [124] H. Zhang, H. Tomoda, N. Tabata, H. Miura, M. Namikoshi, Y. Yamaguchi, R. Masuma, S. Omura, *J. Antibiot.* **2001**, 54, 635-641.
- [125] Y. Xing, G. A. O'Doherty, *Org. Lett.* **2009**, 11, 1107-1110.
- [126] T. Yabuta, *Agric. Hortic.* **1935**, 10, 17-22.
- [127] B. S. Lane, K. Burgess, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 2933-2934.
- [128] M. Molzan, B. Schumacher, C. Ottmann, A. Baljuls, L. Polzien, M. Weyand, P. Thiel, R. Rose, M. Rose, P. Kuhenne, M. Kaiser, U. R. Rapp, J. Kuhlmann, C. Ottmann, *Mol. Cell Biol.* **2010**, 30, 4698-4711.
- [129] C. Wellbrock, M. Karasarides, R. Marais, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, 5, 875-885.
- [130] N. Dumaz, R. Marais, *The Journal of biological chemistry* **2003**, 278, 29819-29823.
- [131] J. Müller, S. Ory, T. Copeland, H. Piwnica-Worms, D. K. Morrison, *Molecular cell* **2001**, 8, 983-993.
- [132] C. Ottmann, M. Weyand, T. Sassa, T. Inoue, N. Kato, A. Wittinghofer, C. Oecking, *J. Mol. Biol.* **2009**, 386, 913-919.
- [133] B. Falini, B. Bigerna, A. Pucciarini, E. Tiacci, C. Mecucci, S. W. Morris, N. Bolli, R. Rosati, S. Hanissian, Z. Ma, Y. Sun, E. Colombo, D. A. Arber, R. Pacini, R. La Starza, B. V. Galletti, A. Liso, M. P. Martelli, D. Diverio, P. g. Pelicci, F. L. Coco, M. F. Martelli, *Leukemia* **2005**, 20, 368-371.
- [134] M. O. Olson, M. O. Wallace, A. H. Herrera, L. Marshall-Carlson, R. C. Hunt, *Biochemistry* **1986**, 25, 484-491.
- [135] N. Yoneda-Kato, A. T. Look, M. N. Kirstein, M. B. Valentine, S. C. Raimondi, K. J. Cohen, A. J. Carroll, S. W. Morris, *Oncogene* **1996**, 12, 265-275.
- [136] N. Matsumoto, N. Yoneda-Kato, T. Iguchi, Y. Kishimoto, T. Kyo, H. Sawada, E. Tatsumi, S. Fukuhara, *Leukemia* **2000**, 14, 1757-1765.

- [137] J. Chen, L. Guo, D. A. Peiffer, L. Zhou, O. T. M. Chan, M. Bibikova, E. Wickham-Garcia, S.-H. Lu, Q. Zhan, J. Wang-Rodriguez, W. Jiang, J.-B. Fan, *Int. J. Cancer* **2008**, 122, 2249-2254.
- [138] W. Sun, K. Zhang, X. Zhang, W. Lei, T. Xiao, J. Ma, S. Guo, S. Shao, H. Zhang, Y. Liu, J. Yuan, Z. Hu, Y. Ma, X. Feng, S. Hu, J. Zhou, S. Cheng, Y. Gao, *Cancer Lett.* **2004**, 212, 83-93.
- [139] R. Lim, L. N. Winteringham, J. H. Williams, R. K. McCulloch, E. Ingley, J. Y.-H. Tiao, J.-P. Lalonde, S. Tsai, P. A. Tilbrook, Y. Sun, X. Wu, S. W. Morris, S. P. Klinken, *The Journal of biological chemistry* **2002**, 277, 40997-41008.
- [140] K. Ohno, Y. Takahashi, F. Hirose, Y. H. Inoue, O. Taguchi, Y. Nishida, A. Matsukage, M. Yamaguchi, *Gene* **2000**, 260, 133-143.
- [141] L. N. Winteringham, R. Endersby, S. Kobelke, R. K. McCulloch, J. H. Williams, J. Stillitano, S. M. Cornwall, E. Ingley, S. P. Klinken, *The Journal of biological chemistry* **2006**, 281, 38791-38800.
- [142] M. Molzan, M. Weyand, R. Rose, C. Ottmann, *FEBS J.* **2012**, 279, 563-571.
- [143] K. L. Bhat, D. M. Flanagan, M. M. Joullié, *Synth. Commun.* **1985**, 15, 587-598.
- [144] C. Ottmann, L. Yasmin, M. Weyand, J. L. Veessenmeyer, M. H. Diaz, R. H. Palmer, M. S. Francis, A. R. Hauser, A. Wittinghofer, B. Hallberg, *The EMBO journal* **2007**, 26, 902-913.
- [145] R. Ortmann, J. Wiesner, A. Reichenberg, D. Henschker, E. Beck, H. Jomaa, M. Schlitzer, *Arch. Pharm.* **2005**, 338, 305-314.
- [146] J. Wiesner, R. Ortmann, H. Jomaa, M. Schlitzer, *Arch. Pharm.* **2007**, 340, 667-669.
- [147] C. Gu, I. Kolodziejek, J. Misas-Villamil, T. Shindo, T. Colby, M. Verdoes, K. H. Richau, J. Schmidt, H. S. Overkleeft, R. A. L. Van Der Hoorn, *Plant J.* **2010**, 62, 160-170.

### 7. Anhang

#### Abkürzungsverzeichnis

Aminosäuren werden gemäß dem Ein- und Drei-Buchstabencode der IUPAC-IUB Kommission für Biochemische Nomenklatur abgekürzt (siehe auch *Eur. J. Biochem.* **1968**, 5, 151–153).

|                          |  |
|--------------------------|--|
| 1D                       | eindimensional                             |
| 2D                       | zweidimensional                            |
| $\delta$                 | chemische Verschiebung                     |
| $\mu\text{g}$            | Mikrogramm                                 |
| $\mu\text{L}$            | Mikroliter                                 |
| $\mu\text{M}$            | Mikromol                                   |
| (DHQ) <sub>2</sub> PHAL  | Hydroquinine-1,4-phthalazinediyl-diether   |
| (DHQD) <sub>2</sub> PHAL | Hydroquinidine-1,4-phthalazinediyl-diether |
| Å                        | Angström                                   |
| <i>A. thaliana</i>       | <i>Arabidopsis thaliana</i>                |
| Abb.                     | Abbildung                                  |
| ABP                      | aktivitätsbasierte Sonde                   |
| ABPP                     | aktivitätsbasiertes Protein Profiling      |
| AD-Mix                   | <i>asymmetric dihydroxylation mix</i>      |
| ADP                      | Adenosindiphosphat                         |
| AFBP                     | affinitätsbasierte Sonde                   |
| AOMKs                    | Peptidacyloxymethylketon                   |
| ASPP                     | aktives Zentrum-Peptid-Profilig            |
| b                        | breites Signal                             |
| Bn                       | Benzyl                                     |
| Boc                      | <i>tert</i> -Butyloxycarbonyl              |
| Boc <sub>2</sub> O       | Di- <i>tert</i> -butyldicarbonat           |
| BODIPY                   | Borondipyrromethen                         |
| n-BuLi                   | n-Butyllithium                             |
| <sup>t</sup> Bu          | <i>tert</i> -Butyl                         |
| <sup>t</sup> BuOH        | <i>tert</i> -Butanol                       |
| Bzl                      | Benzyl                                     |
| °C                       | Grad Celsius                               |
| Cbz                      | Benzyloxycarbonyl                          |



## Anhang

---

|                   |   |
|-------------------|---|
| CCCP              | verbindungszentrierte Chemische Proteomik     |
| CH                | Cyclohexan                                    |
| cm                | Zentimeter                                    |
| d                 | Dublett, Tag                                  |
| DC                | Dünnschichtchromatographie                    |
| DCC               | <i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid          |
| DCM               | Dichloromethan                                |
| dd                | Dublett vom Dublett                           |
| DEA               | Diethylamin                                   |
| DEAE-C            | Diethylaminoethylzellulose                    |
| DEE               | Diethylether                                  |
| DIBAL-H           | Diisobutylaluminiumhydrid                     |
| DIC               | <i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid           |
| DIPEA             | <i>N,N</i> -Diisopropylethylamin              |
| DMAP              | 4-(Dimethylamino)pyridin                      |
| DMF               | <i>N,N'</i> -Dimethylformamid                 |
| DMSO              | Dimethylsulfoxid                              |
| dt                | Dublett von Triplett                          |
| <i>E. coli</i>    | <i>Escherichia coli</i>                       |
| EA, EtOAc         | Ethylacetat                                   |
| EC <sub>50</sub>  | mittlere effektive Konzentration              |
| EDC               | 1-Ethyl-3-dimethylaminopropylcarbodiimid      |
| ee                | Enantiomerenüberschuss                        |
| EGF               | <i>Epidermal Growth Factor</i>                |
| EGFR              | <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>       |
| eq                | Äquivalent                                    |
| ERK               | <i>extracellular-signal regulating kinase</i> |
| et al.            | <i>et alii</i> (lateinisch), und andere       |
| Et <sub>2</sub> O | Diethylether                                  |
| EtOH              | Ethanol                                       |
| ExoS              | Exoenzym S                                    |
| FCA               | Fusicoccin A                                  |
| FKBP              | FK506-bindendes Protein                       |
| Fmoc              | Fluorenylmethoxycarbonyl                      |

## Anhang

---

|                  |   |
|------------------|---|
| g, mg            | Gramm, Milligramm   |
| GAB2             | <i>GRB2-associated binding protein 2</i>  |
| GRB2             | <i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>   |
| h                | Stunde  |
| HATU             | 1-[Bis(dimethylamino)methylen]-1H-1,2,3-triazolo<br>[4,5-b]pyridinium-3-oxid-hexafluorophosphat |
| Hz, MHz          | Hertz, Megahertz  |
| HIV              | Humanes Immundefizienz-Virus  |
| HOBt             | <i>N</i> -Hydroxybenzotriazol   |
| HPLC             | Hochleistungsflüssigkeitschromatographie  |
| HR-MS            | hochauflösende Massenspektrometrie  |
| HTS              | Hochdurchsatz-Screening   |
| IC <sub>50</sub> | mittlere inhibitorische Konzentration   |
| ICAT             | Isotopen-kodierter Affinitäts-Reporter  |
| <i>J</i>         | Kopplungskonstante  |
| K <sub>d</sub>   | Dissoziationskonstante  |
| kDa              | Kilodalton  |
| L, mL            | Liter, Milliliter   |
| LC-MS            | Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-<br>Kopplung                                     |
| LC-MS/MS         | Flüssigkeitschromatographie - Tandem<br>Massenspektrometrie                                     |
| LDA              | Lithiumdiisopropylamid  |
| LDS              | Lithium-Dodecylsulfat   |
| Lit.             | Literatur   |
| m                | multipllett   |
| M, mM            | molar, millimolar   |
| MeCN             | Acetonitril   |
| MeOH             | Methanol  |
| min              | Minute  |
| MLF1             | Myeloid Leukämie Faktor 1   |
| mol, mmol        | Mol, Millimol   |
| MS               | Massenspektrometrie   |
| N                | Molar, Normal   |

## Anhang

---

|                   |  |
|-------------------|--|
| NBS               | N-Bromo-Succinimid   |
| NLS               | Nukleare Lokalisationssequenz                                      |
| nm                | Nanometer  |
| NMO               | <i>N</i> -Methylmorpholin- <i>N</i> -Oxid                          |
| NMR               | Kernspinresonanz   |
| NPC               | <i>no probe control</i>  |
| NPM               | Nucleophosmin  |
| Nu                | Nucleophil   |
| OD <sup>600</sup> | optische Dichte bei $\lambda = 600$ nm                             |
| PBS               | Phosphat-gepufferte Salzlösung                                     |
| PCC               | Pyridiniumchlorochromat  |
| PEG               | Polyethylenglykol  |
| PH                | <i>Pleckstrin homology</i>   |
| pH                | <i>potentia Hydrogenii</i> (Wasserstoffionen-konzentration)        |
| PMA               | Plasmamembran-H <sup>+</sup> -ATPase                               |
| PPI               | Protein-Protein-Interaktion  |
| ppm               | <i>parts per million</i>   |
| PyBOP             | (Benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat |
| q                 | Quartett   |
| RAF               | <i>rat fibrosarcoma</i>  |
| Ras               | <i>rat sarcoma</i>   |
| Ras-RAF-MAPK      | Ras-RAF-mitogen aktivierte Proteinkinasen                          |
| RCM               | ringschließende Metathese  |
| Rh                | Rhodamin   |
| RT                | Raumtemperatur   |
| RuBisCo           | Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase                    |
| s                 | Singulett  |
| SAR               | Struktur-Aktivitäts-Beziehung                                      |
| SDS-PAGE          | Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel<br>Elektrophorese            |
| Shc               | <i>Src homology and collagen homology</i>                          |
| Shp2              | <i>Src Homology Phosphatase 2</i>                                  |

## Anhang

---

|                |  |
|----------------|--|
| SOS            | <i>son of sevenless</i>                          |
| SPR            | Oberflächen-Plasmonresonanz                      |
| t              | Triplett   |
| td             | Triplett von Dublett                             |
| Tab.           | Tabelle  |
| TBAF           | Tetrabutylammoniumfluorid                        |
| TBDMSCI        | <i>tert</i> -Butyldimethylsilylchlorid           |
| TBTA           | Tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin |
| TCEP           | Tris(2-carboxyethyl)phosphin Hydrochlorid        |
| TEA            | Triethylamin                                     |
| TFA            | Trifluoressigsäure                               |
| THF            | Tetrahydrofuran                                  |
| TLC            | <i>thin layer chromatography</i> (siehe DC)      |
| Tris           | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan                 |
| <i>p</i> -TsOH | <i>para</i> -Toluolsulfonsäure                   |
| WT             | <i>wildtype</i>                                  |
| Y2H            | Hefe-2-Hybrid                                    |
| Z              | siehe Cbz  |

**Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.**

**Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.**

### Danksagung

Mein Dank gebührt Herrn Prof. Dr. Markus Kaiser für die Möglichkeit, meine Dissertation unter seiner Betreuung sowohl am Chemical Genomics Centre in Dortmund als auch später am Zentrum für medizinische Biotechnologie in Essen eigenständig durchführen zu können sowie für die guten Ratschläge, Tipps und Diskussionen während dieser Zeit.

Ferner gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Christian Ottmann für die Übernahme des Koreferats, die angenehme Zusammenarbeit bei den interessanten Projekten von 14-3-3 Modulatoren und Inhibitoren sowie dem Rede-und-Antwort stehen bei biologischen Fachfragen.

Meiner Laborkollegin Dr. Sara Christina Stolze möchte ich für die angenehme Zusammenarbeit in den letzten 5 Jahren in Dortmund und Essen danken. Neben angeregten Diskussionen kam auch der Spaß bei der Arbeit nie zu kurz.

Dank dem Engagement von Julian Oeljeklaus und Patrick Hauske kam auch der sportliche Teil in den letzten Jahren nicht zu kurz. So wurde bereits der eine oder andere Abend auf dem Platz ausgetragen oder gemeinsam der BVB angefeuert. Jungs, der Ball ist rund und das Spiel dauert 90 Minuten!

Ohne Daniel Krahn wäre das Freitags-Ritual zur Einstimmung auf das Wochenende wohl nie eingeführt worden. Daniel, am Freitag bleibt die Küche kalt, wir gehen in den Wienerwald.

Timon Mönig danke ich für seine Diskussionsbereitschaft und die angenehmen Abende auf den verschiedenen Meetings und Seminaren.

Meinen Laborkolleginnen Yvonne Blass und Marija Mamic möchte ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre in den letzten 15 Monaten danken, ihr habt in Essen mal etwas Leben in die Bude gebracht und auch nach Feierabend hatten wir schon den einen oder anderen schönen Abend.

Weiterhin gebührt mein Dank Dr. Renier van der Hoorn und der gesamten Plant-Chemetics Arbeitsgruppe am MPIZ in Köln, in dessen Labor ich zwei Forschungsaufenthalte für die biologischen Arbeiten absolvieren durfte und die mir die spannende Welt der Pflanzenbiologie näher gebracht haben.

## Anhang

---

Dr. Farnusch Kaschani möchte ich recht herzlich für seine biologischen Arbeiten an meinen Naturstoffen sowie seiner Diskussionsbereitschaft zu diesem Thema danken.

Unserer Sekretärin Svenja Kernchen möchte ich ganz herzlich dafür danken, dass Sie für verwaltungstechnische Fragen aller Art immer ein offenes Ohr hatte und ohne Sie der eine oder andere Antrag sicherlich der Bürokratie zum Opfer gefallen wäre.

Allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Kaiser, den ehemaligen Kollegen Jérôme Clerc und Zhe Ming Wang, den Mitarbeitern der Gruppe um Dr. Erich Kombrink im MPIZ Köln sowie den Mitarbeitern des Chemical Genomic Centres, des Max-Planck-Institut Dortmund als auch des Zentrums für medizinische Biotechnologie möchte ich für die angenehme und gute Zusammenarbeit sowie Unterstützung danken.

Meinen Freundinnen und Freunden für die angenehme Freizeitgestaltung, auch außerhalb der Bundesrepublik, und die aufmunternden Worte in den letzten Jahren.

Meiner Frau Sabrina Nickel möchte ich von ganzem Herzen danken, dass Sie nicht nur in guten sondern auch in schlechten Zeiten zu mir gestanden hat. Auch wenn es einmal nicht so gut lief, stand Sie mir immer tröstend und mit aufmunternden Worten zu Seite. Ich liebe Dich!

Ein großer Dank gebührt meinen Eltern, welche mir erst mein Studium ermöglicht haben und bei allen meinen Entscheidungen immer hinter mir standen und immer an mich geglaubt haben sowie meinem Bruder Simon.



## Anhang

---

### Eidesstattliche Erklärungen

#### Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. (2) f) der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema *„Design und Synthese von naturstoffbasierten chemischen Sonden und rational-entworfenen Wirkstoffen für 14-3-3 Adapter-Proteine“* zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Philipp Nickel befürworte und die Betreuung auch im Falle eines Weggangs, wenn nicht wichtige Gründe dem entgegenstehen, weiterführen werde.

Essen, den \_\_\_\_\_

Unterschrift eines Mitglieds der Universität Duisburg-Essen

#### Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) c) + e) der Promotionsordnung Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den \_\_\_\_\_

Unterschrift des Doktoranden

#### Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) d) + f) der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät/Fachbereich abgelehnt worden ist.

Essen, den \_\_\_\_\_

Unterschrift des Doktoranden

## Abstract

---

The present thesis consists of two chapters. In the first chapter a new total synthesis of the natural product (-)-A26771B with the help of a ring closing metathesis is described. In comparison to already published synthesis, the presented route describes the first total synthesis of this 16-membered ring via a ring-closing metathesis. To determine the biological targets of the natural product, which has a known antibiotic activity, a modified azide-linked probe (activity-based probe, ABP) of the natural product was synthesized and used in an activity-based protein-profiling (ABPP) approach. Besides, also other biological evaluations of this natural product were performed in this thesis.

Additionally, the adaptability of the established synthesis route was evaluated for the synthesis of 3 members of the Cladospolide family, in detail Cladospolide B to D. In contrast to (-)-A26771B, Cladospolides are 12-membered macrocyclic lactones. Besides, they however display strong structural similarities.

The second chapter consists of the synthesis of modulators of 14-3-3 protein-protein-interactions (PPI). 14-3-3 proteins are involved in different states of diseases. Consequently, modulators of these PPIs might represent promising new chemotherapeutics. To evaluate the applicability of 14-3-3-based PPI modulation, various small molecule modulators of 14-3-3-PPIs were synthesized and evaluated in this thesis. For example, a small molecule library for the stabilization of the 14-3-3/C-Raf and the 14-3-3/MLF1 PPIs was developed.